

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**

Tomás Pellizzaro Pereira

**INTERAÇÃO ENTRE A BACTÉRIA PROMOTORA DE
CRESCIMENTO VEGETAL *Herbaspirillum seropedicae* CEPA
SmR1 E PLANTAS DE MILHO INOCULADAS:
QUANTIFICAÇÃO DE DNA BACTERIANO POR qPCR**

Florianópolis
2014

TOMÁS PELLIZZARO PEREIRA

**INTERAÇÃO ENTRE A BACTÉRIA PROMOTORA DE
CRESCIMENTO VEGETAL *Herbaspirillum seropedicae* CEPA
SmR1 E PLANTAS DE MILHO INOCULADAS:
QUANTIFICAÇÃO DE DNA BACTERIANO POR qPCR**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Ciências, área de
concentração Recursos Genéticos
Vegetais.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina
Maisonnave Arisi.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Tomás Pellizzaro

Interação entre a bactéria promotora de crescimento vegetal *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 e plantas de milho inoculadas: quantificação de DNA bacteriano por qPCR / Tomás Pellizzaro Pereira ; orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi - Florianópolis, SC, 2014.

103 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. 3. Milho. 4. qPCR. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o meu guia e protetor de todos os momentos.

Aos meus pais, João e Any por todos os ensinamentos, apoio, carinho e amor que vocês dedicam a mim. Vocês são e sempre serão a minha inspiração para seguir adiante, mesmo nos momentos mais difíceis. Palavras não são suficientes para definir o que eu sinto por vocês, mas saibam que eu amo vocês com todo o meu coração.

Aos meus irmãos Laísa e Juliano, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado em todos os momentos. Agradeço a Deus por ter o privilégio de ser irmão de vocês. Amo vocês.

A minha namorada Luana, pelo apoio, carinho e paciência comigo. Eu amo você.

Agradeço em especial a minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Carolina Maisonnave Arisi pela orientação, por acreditar e confiar em mim.

Agradeço em especial também aos colegas Fábio Brod, Fernanda Amaral, Jéssica Bueno e a Pamela Dall'Asta por terem contribuído grandemente para a realização deste trabalho. A ajuda de vocês foi fundamental.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular, pelo gratificante convívio diário além de toda a ajuda, conselhos e amizade, Carla, Gustavo, Vanessa, Pedro, Diana, Eliandro, Alex, Ângelo, Cíbele.

A Mirella Scariot pela ajuda e ser tão prestativa. Gostaria também de agradecer as outras meninas da iniciação científica, Gabriela e Joana, pelo auxílio nos experimentos e por sempre ajudarem a manter o laboratório organizado e em bom funcionamento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de ingressar no curso e pelo auxílio financeiro aos eventos.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, fundamental para minha manutenção e realização deste trabalho.

Agradeço também ao Instituto de Ciência e Tecnologia (INCT) Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) pelo apoio financeiro e financiamento do projeto.

“A verdadeira viagem de descobrimento
não consiste em procurar novas paisagens, mas
sim em ter novos olhos”

(Marcel Proust)

PEREIRA, Tomás Pellizzaro. **Interação entre a bactéria promotora de crescimento vegetal *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 e plantas de milho inoculadas: quantificação de DNA bacteriano por qPCR**. 2014. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

O elevado uso de fertilizantes na agricultura vem ocasionando diversos problemas ambientais, tais como eutrofização de rios e mananciais, volatilização e escoamento superficial. Com o objetivo de diminuir a utilização de fertilizantes na agricultura, principalmente os nitrogenados, tem-se utilizado as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), as quais quando em associação com as plantas, promovem o crescimento através da produção e secreção de fitormônios, proteção do hospedeiro contra fitopatógenos e realizam a fixação biológica de nitrogênio. São encontradas atualmente diversas espécies de BPCV capazes de estabelecer associação com plantas, dentre estas destaca-se *Herbaspirillum seropedicae* como um importante microrganismo endofítico capaz de estabelecer associação com diversas culturas de importância econômica, tais como milho, arroz, sorgo, trigo e cana de açúcar. A bactéria *H. seropedicae* cepa SmR1 é um mutante espontaneamente resistente ao antibiótico estreptomicina e teve seu genoma sequenciado e publicado em 2011. Com o avanço na utilização destas bactérias como promotoras de crescimento, métodos para detectar e quantificar a presença destes organismos endofíticos são necessários. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de iniciadores específicos para identificação e quantificação da BPCV *H. seropedicae* cepa SmR1 em plantas de milho inoculadas, através da técnica de PCR em Tempo Real. Foram desenhados dois iniciadores, HERBAS1 e HERBAS2, que foram testados quanto a sua especificidade contra 12 espécies diferentes de bactérias. Após, foram realizadas dez curvas padrões utilizando o iniciador HERBAS1 e diluições seriadas de DNA genômico de *H. seropedicae* SmR1. Foi obtida eficiência de 91% e coeficiente de correlação de 0,99. O limite de detecção observado foi de 10^1 cópias (correspondendo a 60,3 fg de DNA bacteriano) de *H. seropedicae* SmR1. O iniciador HERBAS1 foi utilizado para detecção e quantificação de *H. seropedicae* SmR1 em raízes de plântulas de milho

inoculadas, as quais foram cultivadas *in vitro* e em potes, e coletadas 1, 4, 7 e 10 dias após a inoculação (DAI). Foi observado para as amostras *in vitro* um incremento no número de cópias nas amostras analisadas, variando de 10^7 cópias (um DAI) até 10^9 (dez DAI). Para o experimento em potes foi observado aproximadamente 10^6 cópias de *H. seropedicae* SmR1 nas amostras analisadas. Deste modo, o iniciador HERBAS1 mostrou-se específico para detectar e quantificar *H. seropedicae* SmR1, e este iniciador poderá ser utilizado para monitorar a interação entre planta-bactéria.

Palavras-chave: *Herbaspirillum*, interação planta-bactéria, milho, qPCR.

PEREIRA, Tomás Pellizzaro. **Interaction between the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 and maize plants: bacterial DNA quantification by qPCR.** 2014. Dissertation (Masters in Plant Genetic Resources) – Postgraduate Program in Plant Genetic Resources, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

ABSTRACT

The elevated use of fertilizers in agriculture is leading to several environmental problems, such as eutrophication of rivers and lakes, volatilization and run off. Aiming to reduce the amount of fertilizers used in agriculture, mainly the nitrogenous, the plant growth promoting bacteria (PGPB) has been employed, which when associated with crops, promote growth through the production and secretion of phytohormones, protect the host against phytopathogens and perform nitrogen biological fixation. Several PGPB species are found today, which are capable to establish an association with plants, however, *Herbaspirillum seropedicae* is the one that stands out as an important endophytic microorganism able to create an association with several economic importance crops, such as maize, rice, sorghum, wheat and sugar cane. The *H. seropedicae* bacteria strain SmR1 is a mutant spontaneously resistant to streptomycin antibiotic and had its genome sequenced and published in 2011. With the progress in the utilization of those bacteria as growth promoters, methods to detect and quantify the presence of these endophytic organisms are needed. In this sense, this study aimed the development of specific primers to identification and quantification of the PGPB *H. seropedicae* strain SmR1 in maize plants inoculated, through the Real Time PCR. Two primer pairs were designed, HERBAS1 and HERBAS2. They were tested regarding its specificity against 12 different species of bacteria. Afterwards, ten standard curves were performed using the HERBAS1 primer pair and serial dilutions of *H. seropedicae* SmR1 genomic DNA. Efficiency of 91% and correlation coefficient of 0.99 were obtained. The detection limit of 10^1 copies was observed (corresponding to 60.3 fg of bacterial DNA) of *H. seropedicae* SmR1. The HERBAS1 primer was used for detection and quantification of *H. seropedicae* SmR1 in inoculated maize roots, which were cultivated *in vitro* and in pots, and collected

after 1, 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI). Was observed for *in vitro* samples an increase in the copy number in the analyzed samples, ranging from 10^7 copies (one DAI) until 10^9 copies (ten DAI). In the pots experiment, was observed approximately 10^6 copies of *H. seropedicae* SmR1 in the analyzed samples. Therefore, the primer pair HERBAS1 proved to be sensitive enough to detect and quantify *H. seropedicae* SmR1, thus this primer pair could be used to monitor the plant-bacteria interaction.

Key-words: *Herbaspirillum*, plant-bacteria interaction, maize, qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

- Figura 1.1.** Gráfico de utilização de fertilizantes e área agrícola irrigada mundialmente, compreendido entre os anos 1960 e 2000..... 28
- Figura 1.2.** Adesão e colonização de tecidos vegetais por *H. seropedicae* 42
- Figura 1.3.** Gráfico de amplificação da PCR em Tempo Real. 47

CAPÍTULO 2

- Figure 2.1.** qPCR standard curves for *Herbaspirillum seropedicae* quantification generated using 3 DNA extractions from *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 as template DNA and HERBAS1 primers. A) Ct versus log DNA copy number. Average Ct \pm SD (n = 21). B) Ct versus log CFU (n = 6)..... 62
- Figure 2.2.** qPCR standard curve generated using 4 DNA extractions from maize (*Zea mays*) as template DNA and ZM1 (hmg) primers for qPCR quantification of maize DNA. Average Ct \pm SD (n = 10). 69
- Figure 2.3.** Bacterial DNA copy number/g of root (fresh weight) of maize seedlings grown *in vitro* after inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 DKB240 variety. Inoculated samples collected 1, 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI). Data are presented as means \pm SD (n=9)..... 70
- Figure 2.4.** Bacterial DNA copy number/g of root (fresh weight) of maize seedlings grown in pots after inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 DKB240 variety. Inoculated samples collected 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI). Data are presented as means \pm SD (n=9)..... 71
- Figure 2.5.** Ratio bacterial DNA copy number per maize DNA copy number of maize seedlings grown *in vitro* after inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 DKB240 variety. Inoculated samples collected 1, 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI). Data are presented as means \pm SD (n=9)..... 72
- Figure S1.** Melt curve of qPCR using primer pair HERBAS1 of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 (red line) and 12 bacteria: *Herbaspirillum hiltneri*, *Herbaspirillum huttiense*, *Herbaspirillum*

lusitanum, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum frisingense*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium* sp, *Microbacterium* sp and *Pseudomonas* sp..... 98

Figure S2. Melt curve of qPCR using primer pair HERBAS2 of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 (red line) and 6 bacteria: *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum hiltneri*, *Herbaspirillum huttiense*, *Herbaspirillum lusitanum*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum brasilense*..... 101

Figure S3. Electrophoresis gel of qPCR amplicon using primers HERBAS1 (76 bp; lanes 2 to 7) and HERBAS2 (63 bp; lanes 8 to 13). Samples: 1 – 50 bp DNA ladder; 2 – *H. hiltneri*, 3 – *H. huttiense*, 4 – *H. lusitanum*, 5 – *H. rubrisubalbicans*, 6 – *H. frisingense*, 7 – *H. seropedicae* SmR1; 8 – *H. hiltneri*, 9 – *H. huttiense*, 10 – *H. lusitanum*, 11 – *H. rubrisubalbicans*, 12 – *H. frisingense*, 13 – *H. seropedicae* SmR1; 14, 15 – Water..... 103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1. Os 10 países maiores produtores de milho do mundo. 26

Tabela 1.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) com evidências de estímulo ao crescimento em plantas. 31

Tabela 1.3. Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e a produção de fitormônios em culturas comerciais. 35

CAPÍTULO 2

Table 2.1. Primers used for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and maize (*Zea mays*) PCR detection and real time PCR quantification (qPCR)..... 57

Table 2.2. Ct and Tm values generated by qPCR specificity assay using primers HERBAS1 and HERBAS2 and DNA extracted from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 or other bacteria as template DNA..... 60

Table 2.3. Parameters of qPCR standard curves for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 detection using HERBAS1 primers and bacterial DNA serial dilution. 63

Table 2.4. Comparison of Ct values obtained for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 qPCR assay using HERBAS1 primers and ten independent serial dilutions of three bacterial DNA extracts..... 65

Table 2.5. qPCR mean Ct values obtained from three DNA extracts in different days used for the determination of repeatability..... 66

Table 2.6. qPCR mean Ct values obtained from three different DNA extracts in three different PCR runs, used for the determination of repeatability. 67

Table 2.7. Parameters of qPCR standard curves for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 quantification using inoculated maize root DNA serial dilution or bacterial DNA serial dilution in the presence of background control maize root DNA. 68

Table S1. Plate counting (aliquot 0.1 mL) of *H. seropedicae* SmR1 culture (OD_{600nm} 0.8) after serial dilution..... 95

Table S2. Ct and Tm values generated by qPCR specificity assay with two annealing temperatures (61 or 63°C) using primers HERBAS1 and DNA extracted from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 or other bacteria as template DNA 96

Table S3. Parameters of qPCR standard curves for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 detection with two annealing temperatures (61 or 63°C) conditions using primers HERBAS1 and bacterial DNA serial dilution..... 97

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
CAPÍTULO 1.....	25
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1.1. A CULTURA DO MILHO	25
1.2. O IMPACTO DA UTILIZAÇÃO DE FERTILIZANTES NO MUNDO	27
1.3. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)	29
1.3.1. Mecanismos Diretos De Promoção De Crescimento Planta-Microrganismos.....	32
1.3.1.1. Produção De Fitormônios E Vitaminas.....	32
1.3.1.2. Fixação Biológica De Nitrogênio.....	36
1.3.1.3. Solubilização De Fosfatos	38
1.3.2. Mecanismos Indiretos De Promoção Do Crescimento De Plantas E Fitorremediação.....	39
1.3.2.1. Indução De Respostas De Resistência Sistêmica Em Plantas.....	39
1.4. <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	40
1.5. PCR QUANTITATIVA (qPCR).....	45
CAPÍTULO 2.....	51
2. REAL TIME PCR QUANTIFICATION OF THE PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA <i>HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE</i> STRAIN SMR1 IN MAIZE ROOTS	52
2.1. INTRODUCTION	52
2.2. MATERIAL AND METHODS	54
2.2.1. Bacterial strains.....	54
2.2.2. Germination, inoculation and growth of seedlings	54

2.2.3.	DNA extraction protocols	55
2.2.4.	Primer design	56
2.2.5.	Real-time PCR quantification	58
2.2.6.	Construction of standard curves.....	58
2.3.	RESULTS	59
2.3.1.	Primer specificity	59
2.3.2.	qPCR reaction parameters for <i>H. seropedicae</i> SmR1 quantification	61
2.3.3.	qPCR reaction parameters for maize quantification	68
2.3.4.	Quantification of <i>H. seropedicae</i> DNA in maize root samples.....	69
2.3.5.	Quantification of maize DNA in maize root samples	71
2.3.6.	Ratio between <i>H. seropedicae</i> SmR1 and maize copy numbers.....	71
2.4.	DISCUSSION.....	72
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
	APÊNDICES	95

INTRODUÇÃO

Atualmente o milho (*Zea mays*) é o cereal mais extensivamente cultivado em todo o mundo, seguido por trigo e arroz. Apresentando uma produção total de cerca de 875 milhões de toneladas no ano de 2012, o milho é considerado um alimento de primeira necessidade (*staple food*) para boa parte da população mundial. O milho é considerado também uma das principais fontes de nutrientes para alimentação animal, além de apresentar diversos usos na indústria, que vão desde a produção de adesivos a produtos têxteis e biocombustíveis (FAOSTAT, 2012; PECHANOVA et al., 2013; YAN; Warburton; Crouch, 2011).

Desde o início do século 20, o milho tem sido considerado como um organismo modelo para os estudos de biologia e genética de monocotiledôneas, e atualmente é um dos organismos genéticos mais sistematicamente estudados. Além disso, o milho é uma planta com mecanismo fotossintético C4, sendo por isso considerada também como um organismo modelo para o estudo das plantas com mecanismo fotossintético do tipo C4 (PECHANOVA et al., 2013).

Com o aumento da produção de grãos observado nos últimos anos, houve uma crescente demanda por fertilizantes químicos para suplementar as lavouras comerciais espalhadas por todo o mundo. No entanto, o uso indiscriminado de fertilizantes tem ocasionado sérios problemas para o meio ambiente, levando a degradação dos recursos naturais e afetando negativamente diversas funções ecológicas do solo (SHAHZAD et al., 2013). Como uma alternativa para a reduzir a elevada aplicação de fertilizantes químicos na agricultura surgem as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), que são bactérias de vida livre que apresentam importância para a agricultura quando em associação com culturas de importância econômica (ARRUDA et al., 2013).

As BPCV podem estimular efeitos benéficos na saúde e crescimento das plantas, dentre estes efeitos pode-se destacar a supressão de agentes patogênicos e aumento na disponibilidade e assimilação de nutrientes. Além disso, as BPCV podem melhorar a fertilidade de solos e diminuir os impactos negativos causados ao ambiente devido ao uso de fertilizantes químicos (BABALOLA, 2010). Pode-se destacar também que o uso de bactérias endofíticas pode auxiliar nos processos de fitorremediação devido ao estresse causado por metais pesados e estas bactérias ainda apresentam capacidade de

absorver grandes quantidades de metais pesados (LUO et al., 2011; MIRANSARI, 2011).

As plantas pertencentes a família Poacea (Gramíneas) tem sido conhecidas por ter grande potencial para estabelecer interação com algumas espécies de BPCV, tais como as pertencentes aos gêneros *Azoarcus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (MONTEIRO, R. A. et al., 2012; VARGAS et al., 2012). Algumas destas bactérias apresentam capacidade endofítica, o que significa que estas colonizam não só a rizosfera e a superfície das raízes, como também o interior das raízes, particularmente os espaços intercelulares e o tecido vascular, mas sem desenvolver nenhuma estrutura simbiótica especializada, como nódulos, e também não desenvolvem sintomas de doenças (JAMES, E. K., 2000; JAMES, E. K.; OLIVARES, 1998; VARGAS et al., 2012).

Dentre as BPCV, pode-se destacar a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, a qual é uma bactéria endofítica que é conhecida por estabelecer associação simbiótica com diversas culturas de importância econômica, tais como milho, arroz, sorgo, trigo e cana de açúcar (BALDANI, J. et al., 1986; BALSANELLI et al., 2010; JAMES, E. K.; OLIVARES, 1998; JAMES, E. K. et al., 1997). *H. seropedicae* pode estimular o crescimento vegetal através da produção e secreção de fitormônios, proteção da planta hospedeira contra microrganismos patogênicos, ou por suprir nitrogênio fixado para o hospedeiro (BALDANI, J. et al., 1986; BALSANELLI et al., 2010; ELBELTAGY et al., 2001; GYANESHWAR et al., 2002).

A bactéria *H. seropedicae* cepa SmR1, um mutante espontaneamente resistente ao antibiótico estreptomicina da estirpe Z78 (ATCC 35893), que foi isolado a partir de sorgo e é atualmente uma das cepas mais bem estudadas (MONTEIRO, R. A. et al., 2012). *H. seropedicae* SmR1 teve seu genoma sequenciado e publicado em 2011 através do Programa Genoma Estado do Paraná (Genopar Consortium, www.genopar.org) (PEDROSA et al., 2011).

Apesar de diversos estudos serem conduzidos com o intuito de esclarecer como a interação planta-bactéria ocorre, os mecanismos moleculares de infecção e colonização ainda não são completamente entendidos e o melhor entendimento deste processo é um passo necessário para garantir que os organismos diazotróficos endofíticos possam ser utilizados adequadamente no sentido de promover o crescimento vegetal (BALSANELLI et al., 2010; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012; MONTEIRO et al., 2008). Deste modo, o estabelecimento de uma metodologia que seja capaz de identificar e

quantificar, rápida e confiavelmente, a presença de microrganismos endofíticos em plantas inoculadas se faz necessário. Por este motivo, diversos trabalhos vêm sendo realizados utilizando a técnica da PCR quantitativa objetivando a detecção e quantificação de microrganismos associados a plantas (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010; TIMMUSK et al., 2009). Sendo assim, a técnica da PCR quantitativa se mostra como uma ferramenta rápida e confiável para utilização em trabalhos de detecção e quantificação de microrganismos.

Esta dissertação será apresentada em forma de capítulos, sendo o primeiro capítulo uma revisão de literatura sobre a cultura do milho, a utilização de fertilizantes na agricultura mundial, as bactérias promotoras de crescimento vegetal e os benefícios destas quando em associação simbiótica com plantas. Também discorre-se a respeito da técnica de PCR quantitativa e a aplicação desta nos estudos envolvendo microrganismos.

No Capítulo 2 é apresentado o artigo científico sobre a quantificação de DNA da bactéria promotora de crescimento vegetal *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 em plantas de milho inoculadas. Este trabalho contou com financiamento do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, UFSC.

Por fim, são feitas considerações finais sobre os resultados obtidos neste trabalho, através do desenvolvimento de iniciadores para detecção e quantificação de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e as possíveis perspectivas de utilização destes como ferramenta para elucidação da interação planta – bactéria.

Deste modo, o presente estudo teve por objetivo avaliar a inoculação do híbrido de milho Dekalb DKB240 com a bactéria promotora de crescimento vegetal *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 através do desenvolvimento de iniciadores específicos para identificação e quantificação de DNA bacteriano por meio da técnica de PCR quantitativo.

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A CULTURA DO MILHO

Originário dos planaltos mexicanos há cerca de 5000 a 10000 anos atrás, o milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea, monocotiledônea, pertencente à família Poacea. Domesticado a partir de uma gramínea selvagem nativa do México e América Central, o teosinto (*Zea mays* subsp. *parviglumis*), o milho atualmente é cultivado mundialmente, sendo considerado um dos cereais mais importantes do mundo (DERMASTIA et al., 2009; FASOLI et al., 2009; MATSUOKA et al., 2002; PECHANOVA et al., 2013).

Cultivado em praticamente todo o mundo devido a sua versatilidade de produção, o milho possui facilidade de processamento e digestão além de ter um custo de produção relativamente mais baixo se comparado com outros cereais. Além disso, o milho é importante não apenas para a alimentação humana, mas é também um alimento básico para alimentação animal, importante matéria prima para produção industrial de alimentos processados e óleos para culinária, além de ser uma importante fonte de biocombustíveis (FASOLI et al., 2009; YAN et al., 2011).

O milho também é considerado uma planta modelo para os estudos envolvendo genética, citogenética e genômica funcional, e que contribuiu significativamente para o entendimento de processos fundamentais que incluem reprodução, fotossíntese, biossíntese de metabólitos primários, elementos móveis e a relação entre estrutura-função dos cromossomos (WEI et al., 2007; YAN et al., 2011; ZHOU et al., 2009). Além disso, devido ao fato do milho ser uma planta que apresenta sistema de polinização cruzada, esta possui um extraordinário nível de diversidade genotípica, o qual é de grande interesse para a pesquisa, pois auxilia na elucidação de importantes questões relacionadas a evolução, recombinação, transposição, heterozigose, identidade genômica, e fenômenos epigenéticos (PECHANOVA et al., 2013).

Os avanços na pesquisa da cultura do milho ganharam uma importante ferramenta em 2009 através da disponibilidade do genoma completo da linhagem B73 de milho (SCHNABLE, 2012). Além disso, devido ao processo de melhoramento vegetal que vem acontecendo,

principalmente a partir do último século, conseguiu-se elevar o rendimento da cultura cerca de oito vezes, através de ferramentas moleculares de melhoramento genético vegetal (tais como o melhoramento assistido por marcadores moleculares – MAS, e estudo sobre QTL) e da exploração do vigor híbrido, que em alguns casos pode elevar o rendimento da cultura de 15 a 60%, dependendo da linhagem parental (LI et al., 2013; SCHNABLE, 2012; WENDE et al., 2013; ZHANG, G. D. et al., 2013).

Atualmente o milho é o cereal mais cultivado no mundo, com uma produção mundial total de cerca de 875 milhões de toneladas, sendo que o Brasil ocupa lugar de destaque no cenário mundial de produção desta cultura, com uma produção de aproximadamente 71,3 milhões de toneladas em 2012 (Tabela 1.1), é o terceiro maior produtor mundial de milho, ficando atrás apenas de Estados Unidos e China (FAOSTAT, 2012).

Tabela 1.1. Os 10 países maiores produtores de milho do mundo.

País	Produção (ton)
Estados Unidos da América	273832130
China	208130000
Brasil	71296478
Argentina	25700000
México	22069254
Índia	21060000
Ucrânia	20961300
Indonésia	19377030
França	15614100
África do Sul	12500000

Fonte: adaptado de FAOSTAT (2012).

Os altos índices de produção de grãos obtidos atualmente, especialmente para a cultura do milho, se devem ao fato de que nos últimos 40 anos a produção mundial de cereais praticamente dobrou devido, principalmente, ao aumento do uso de fertilizantes, de recursos hídricos e pesticidas, da adoção de novas cultivares e outras tecnologias provenientes da “Revolução Verde” (TILMAN et al., 2002). Além

disso, com a crescente demanda por alimentos devido ao crescimento da população mundial, a busca por elevados índices de produção de grãos tem aumentado, ocasionando, dentre outros aspectos, o crescimento no uso de fertilizantes químicos (MIRANSARI, 2011).

Em 2050, estima-se que a população mundial seja aproximadamente 50% maior que a atual, com cerca de 9 bilhões de pessoas, as quais irão demandar cerca de 70% mais alimentos que a população atual (YAN et al., 2011). No entanto, a estimativa do aumento na produção mundial de grãos é apenas o dobro do que é atualmente, havendo a necessidade de elevar os índices de produção, seja através do melhoramento genético vegetal ou da mudança nas práticas agronômicas. Contudo, o risco de aumentar os índices de produtividade traz consigo altos custo ambientais devido, principalmente, da aplicação maciça de fertilizantes sintéticos (ROBERTSON; VITOUSEK, 2009; TILMAN et al., 2002; YAN et al., 2011).

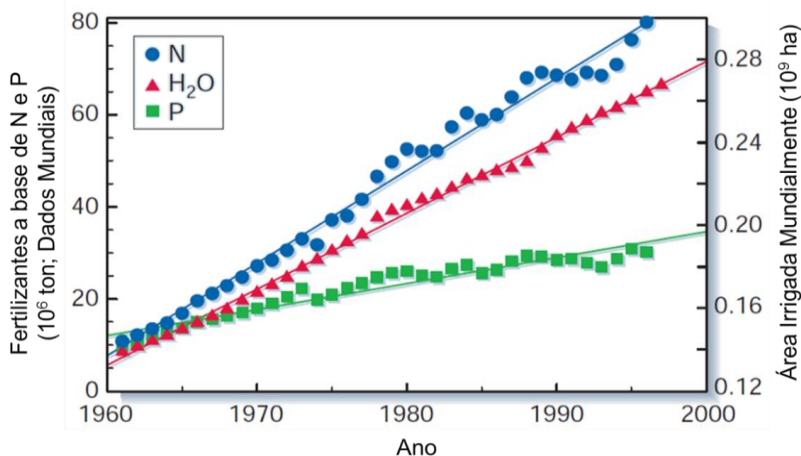
1.2. O IMPACTO DA UTILIZAÇÃO DE FERTILIZANTES NO MUNDO

Anualmente são aplicados mundialmente cerca de 176 milhões de toneladas de fertilizantes químicos com o objetivo de melhorar o rendimento de diversas culturas de importância econômica (SHAHZAD et al., 2013). No entanto, a elevada utilização de fertilizantes químicos na agricultura tem ocasionado diversos problemas ao meio ambiente, tais como lixiviação, escoamento superficial, volatilização e eutrofização dos sistemas aquáticos (MIRANSARI, 2011; VESSEY, 2003).

Dentre os principais nutrientes que são aplicados no solo para suprir a demanda das plantas e assim melhorar o rendimento de grãos das culturas, destaca-se o nitrogênio como o nutriente mais limitante para o rendimento final dos cultivos, principalmente de plantas não-leguminosas, onde são aplicados enormes quantidades deste nutriente (GRANT et al., 2012). Devido a adoção de novas práticas de cultivos advindas da “Revolução Verde”, a utilização do nitrogênio em cultivos comerciais praticamente quadruplicou entre os anos de 1960 e 2000 (Figura 1.1), e isso vem ocasionando diversos problemas ambientais, tais como a poluição de rios e mananciais, prejudicando a saúde da população, aumentando os custo com a despoluição da água e diminuindo o potencial pesqueiro de rios (TILMAN et al., 2002).

Os principais problemas ambientais associados a utilização excessiva de adubação nitrogenada estão relacionados a volatilização, imobilização, denitrificação, e escoamento superficial (GRANT et al., 2012; MIRANSARI, 2011; ZIADI et al., 2013). Além disso, estudos realizados com a produção de cereais indicaram que a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados está entre 33 e 36%, levando a perda de boa parte do nitrogênio aplicado no solo (LADHA et al., 2005; LIANG et al., 2013). Atualmente, estima-se que o nitrogênio não utilizado representa uma perda de mais de 90 milhões de dólares anualmente, sendo por isso recomendado ajustar a quantidade de N que será aplicada no solo, para assim evitar desperdícios, além de evitar a poluição desnecessária ao meio ambiente (LIANG et al., 2013; MULVANEY; KHAN; ELLSWORTH, 2009; ZIADI et al., 2013).

Figura 1.1. Gráfico de utilização de fertilizantes e área agrícola irrigada mundialmente, compreendido entre os anos 1960 e 2000.



Fonte: adaptado de TILMAN *et al.*, (2002)

Uma alternativa viável para diminuir a aplicação de fertilizantes químicos seria a utilização de fertilizantes orgânicos, através da adição de estrume e resíduos de plantas, além da utilização de plantas leguminosas como fertilizantes verdes e o uso de microrganismos do solo. A utilização de resíduos de plantas como fertilizantes orgânicos

tem como vantagens a melhora na estrutura do solo, o aumento na disponibilidade de nutrientes, e benefícios para o meio ambiente. Além disso, a utilização de fertilizantes orgânicos pode aumentar o teor de matéria orgânica do solo e realiza a liberação de nitrogênio durante o desenvolvimento da planta (MIRANSARI, 2011; MONTEMURRO et al., 2006). No entanto, quando compara-se a quantidade de fertilizantes inorgânicos utilizado na adubação do solo (em quilogramas por hectare), a eficiência dos fertilizantes orgânicos é muito menor, pois é necessário uma quantidade muito superior deste (em toneladas por hectare) para suprir adequadamente as necessidades nutricionais das plantas (MIRANSARI, 2011; ROBERTSON; VITOUSEK, 2009).

Uma outra alternativa para a utilização de fertilizantes químicos e orgânicos como forma de suprir os nutrientes necessários para desenvolvimento das plantas e aumentar o rendimento de grãos, é o uso dos microrganismos do solo, tais como as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e os fungos promotores de crescimento vegetal (FPCV), os quais são comprovadamente vantajosos para melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas através de melhora no status nutricional das plantas e proteção destas contra diversas formas de estresse biótico e abiótico (MIRANSARI, 2011; ZAMIOUDIS et al., 2013). Além disso, diminuir a dependência dos fertilizantes nitrogenados e adotar práticas agrícolas sustentáveis, através da utilização de organismos fixadores de nitrogênio, tais como as BPCV, poderá beneficiar não só os sistemas agrícolas, mas também o meio ambiente como um todo (OLIVARES, J.; BEDMAR; SANJUAN, 2013).

1.3. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

A utilização do termo bactérias promotoras de crescimento vegetal foi concebida há mais de 30 anos, mais precisamente no final dos anos 70 (KLOEPPER; SCHROTH, 1979), e desde então tem sido crescente a utilização desta em pesquisas visando a interação planta – microrganismos (BABALOLA, 2010; VESSEY, 2003). Atualmente as BPCV vem sendo denominadas também de biofertilizadores, apesar de não haver uma definição exata para biofertilizador, este termo refere-se ao uso de microrganismos com o objetivo de aumentar a disponibilidade e captação de nutrientes minerais pelas plantas (BABALOLA, 2010; BHATTACHARJEE; SINGH; MUKHOPADHYAY, 2008; VESSEY, 2003).

As BPCV são definidas como um grupo heterogêneo de bactérias de vida livre que podem se associar a rizosfera de plantas e que contribuem para o crescimento e desenvolvimento de plantas de interesse econômico, direta e/ou indiretamente (ESTRADA et al., 2013; FAN et al., 2011). Diretamente através da fixação do nitrogênio atmosférico; solubilização de compostos minerais como fósforo; produção de sideróforos (quelantes de ferro); produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal, tais como auxina, giberelina, citocinina e etileno; e indiretamente através do antagonismo a organismos fitopatogênicos tais como fungos, vírus e nematoides e indução da resistência sistêmica contra doenças (ARRUDA et al., 2013; LIU, F. C. et al., 2013; VAN LOON, 2007; VARGAS et al., 2012; VESSEY, 2003).

As BPCV podem penetrar no tecido vegetal através dos pelos radiculares, zonas de alongação, pontas de raízes e axilas de emergência de raízes secundárias e então colonizam locais de células lisadas e espaços intracelulares, e com menor frequência, também tem a capacidade de colonizar células do xilema e tecidos vasculares. A invasão das células dos tecidos vegetais pode requerer a produção de enzimas líticas para facilitar o processo de colonização (MITTER et al., 2013; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011).

Dentre as espécies de BPCV, destacam-se as pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Ochrobactrum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Zoogloea*, como sendo os gêneros que comprovadamente atuam no crescimento diferencial das plantas (BABALOLA, 2010). Além disso, na Tabela 1.2 destacam-se os gêneros de BPCV e a sua relação com as plantas hospedeiras e a espécie onde pode ser encontrada em associação.

Devido as BPCV exercerem efeitos benéficos na produtividade de plantas e representar uma potencial alternativa para o uso intensivo de fertilizantes artificiais e pesticidas nos sistemas agrícolas, têm-se empregado estas bactérias com o objetivo de auxiliar no crescimento e desenvolvimento de culturas de importância econômica (CARVALHAIS et al., 2013). As BPCV podem promover o crescimento de plantas através da produção de moléculas orgânicas que são necessárias em determinadas quantidades pelas plantas e que podem resultar no crescimento vegetal (BABALOLA, 2010; VAN LOON, 2007).

Tabela 1.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) com evidências de estímulo ao crescimento em plantas.

Bactéria	Relação com o hospedeiro	Cultura hospedeira	Referência
<i>Azospirillum</i> sp.	Rizosfera	Milho	(DESALAMONE et al., 1996)
		Arroz	(MALIK et al., 1997)
		Trigo	(BODDEY et al., 1986)
<i>Azotobacter</i> sp.	Rizosfera	Milho	(PANDEY; SHARMA; PALNI, 1998)
		Trigo	(MRKOVACKI; MILIC, 2001)
<i>Burkholderia</i> sp.	Endofítico	Arroz	(BALDANI, V.; BALDANI; DOBEREINER, 2000)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Endofítico	Sorgo	(ISOPI et al., 1995)
		Cana de açúcar	(BODDEY et al., 2001) (SEVILLA et al., 2001)
<i>Herbaspirillum</i> sp.	Endofítico	Arroz	(JAMES, E. et al., 2002)
		Sorgo	(JAMES, E. K. et al., 1997)
		Cana de açúcar	(PIMENTEL et al., 1991)

Fonte: adaptado de VESSEY (2003)

1.3.1. Mecanismos Diretos De Promoção De Crescimento Planta-Microrganismos

1.3.1.1. Produção De Fitormônios E Vitaminas

Dentre os promotores de crescimento produzidos pelas BPCV e que atuam no crescimento diferencial de plantas, destaca-se a produção de fitormônios, os quais contribuem nas taxas de respiração das raízes dos hospedeiros, metabolismo e abundância de raízes, além de melhorar a captação de água e minerais pelas plantas inoculadas (BABALOLA, 2010). Os principais fitormônios produzidos pelas BPCV são auxina, giberelina, etileno, e citocinina (BERGER; BROCK; RUPPEL, 2013; HAYAT et al., 2010). A seguir, descreve-se brevemente como esses quatro importantes fitormônios estão relacionados com a interação planta-bactéria e o crescimento diferencial das plantas:

- A auxina é um dos fitormônios que apresenta produção mediada pelas BPCV mais relatada na literatura. Isso porque ele é de grande importância para o desenvolvimento das plantas, pois este influencia o crescimento radicular, alongação celular, diferenciação dos tecidos, promove o crescimento da planta e atua na resposta das plantas a luz e a gravidade (BABALOLA, 2010; BALDANI, J. I.; BALDANI, 2005; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011; VESSEY, 2003). As auxinas são o grupo de fitormônios mais importantes produzidos pelas bactérias *Azospirillum*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* (BABALOLA, 2010; BASTIAN et al., 1998; COUILLEROT et al., 2013; VESSEY, 2003);
- As giberelinas são um dos mais importantes grupos de fitormônios de ocorrência nas plantas pois atuam influenciando a germinação de sementes, a alongação do caule, o florescimento e frutificação em plantas superiores. Estudos avaliando a produção de giberelinas em diversas espécies de plantas, fungos e bactérias, verificaram a produção de quatro giberelinas (GA1, GA3, GA4 e GA20) em sete espécies de bactérias, dentre elas destaca-se o *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, que são

BPCV de ampla ocorrência em gramíneas de importância econômica, como o milho, trigo e cana de açúcar (BASTIAN et al., 1998; MACMILLAN, 2001);

- Outro importante fitormônio produzido pelas BPCV é o gás etileno, o qual é um produto do metabolismo da planta e é requerido na quebra da dormência de sementes, aumento no número de raízes, indução ao florescimento, abscisão de folhas e frutos e amadurecimento de frutos (BABALOLA, 2010; BABALOLA et al., 2007). Além de ser conhecido como um promotor de crescimento para as plantas, o etileno é também um hormônio sinalizador de estresses devido a condições de salinidade elevada, seca ou condições de metais pesados. Devido a condições de estresse elevado, os teores de etileno produzido pela planta aumentam substancialmente, afetando negativamente o crescimento radicular (BABALOLA, 2010; SALEEM et al., 2007). As BPCV tem a capacidade de induzir a enzima 1-aminociclopropano-carboxilato (ACC) deaminase e assim regular a produção de etileno pela planta. Devido ao fato da ACC ser um precursor direto do etileno, a diminuição da concentração de etileno regulada pela bactéria em combinação com a auxina, irá resultar no crescimento da planta, em especial no desenvolvimento radicular (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011; SHAHZAD et al., 2013; VARGAS et al., 2012);
- As citocininas são fitormônios produzidos pelas plantas e que controlam diversos mecanismos do crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como a divisão celular, diferenciação dos cloroplastos, senescência foliar e sinalização nutricional (ARKHIPOVA et al., 2007; YONEKURA-SAKAKIBARA et al., 2004). Microrganismos são capazes de sintetizar citocinina e consequentemente as bactérias do solo conseguem aumentar a quantidade de citocinina e assim promover o crescimento de plantas. Dentre as BPCV capazes de sintetizar citocininas, destaca-se *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum*, *Azospirillum* spp., *Arthrobacter* spp., e

Pseudomonas spp. (ARKHIPOVA et al., 2007; HUSSAIN; HASNAIN, 2011; VESSEY, 2003).

Na Tabela 1.3 encontra-se resumidamente algumas BPCV com evidencia de promoção do crescimento vegetal de plantas por meio da produção de fitormônios.

Tabela 1.3. Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e a produção de fitormônios em culturas comerciais.

Fitormônio produzido	BPCV	Planta hospedeira	Referências
IAA (auxina)	<i>Agrobacterium</i> sp.	Alface	(BARAZANI; FRIEDMAN, 1999)
	<i>Alcaligenes piechaudii</i>	Alface	(BARAZANI; FRIEDMAN, 1999)
	<i>Azospirillum brasilense</i>	Trigo	(KAUSHIK; SAXENA; TILAK, 2000)
	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Rabanete	(ANTOUN et al., 1998)
	<i>Comamonas acidovorans</i>	Alface	(BARAZANI; FRIEDMAN, 1999)
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Rabanete	(ANTOUN et al., 1998)
Citocinina	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Trigo	(TIMMUSK et al., 1999)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Soja	(DE SALAMONE; HYNES; NELSON, 2001)
	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Colza e alface	(NOEL et al., 1996)
Giberelina	<i>Bacillus</i> sp.	Amieiro	(GUTIERREZ-MANERO et al., 2001)

Fonte: adaptado de BHATTACHARYYA *et al.*, (2012)

Estudos recentes também evidenciaram a capacidade de produção de vitaminas atribuídas as BPCV, especialmente vitaminas hidrossolúveis pertencentes ao grupo B (BABALOLA, 2010; HAYAT et al., 2010; MITTER et al., 2013). Outros estudos evidenciaram a produção de outras vitaminas, por exemplo ácido pantotênico e tiamina foram produzidos em meio contendo *Azotobacter vinelandii* (MARTINEZTOLEDO et al., 1996), além de niacina, riboflavina, e biotina (HAYAT et al., 2010; REVILLAS et al., 2000; SIERRA et al., 1999)

1.3.1.2. Fixação Biológica De Nitrogênio

Outro mecanismo de crescimento e nutrição das plantas que é estimulado pelas BPCV é a realização da fixação biológica de nitrogênio. O nitrogênio é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois este é essencial para os processos de síntese celular de enzimas, proteínas, clorofila, DNA e RNA, além disso, é um dos principais elementos limitantes ao crescimento e produção de grãos e alimentos (HAYAT et al., 2010; MITTER et al., 2013; MONTEIRO, R. A. et al., 2012).

Devido a elevada demanda nutricional de nitrogênio pelas plantas e a busca por produtividades de grãos cada vez maiores, tem ocorrido o uso de grandes quantidades de fertilizantes químicos nitrogenados, principalmente após a Revolução Verde. No entanto, a utilização de grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados tem ocasionado sérias perturbações ao meio ambiente, tais como o aumento nos teores de nitrato no solo e com consequente lixiviação para o lençol freático além do aumento de óxidos de nitrogênio na atmosfera, e por este motivo, a busca por alternativas para a redução do uso de fertilizantes nitrogenados tem sido cada vez maior (MONTEIRO, R. A. et al., 2012; OLIVARES, J. et al., 2013). Neste contexto as BPCV surgem como uma alternativa para diminuir a utilização de fertilizantes nitrogenados nos sistemas agrícolas atuais (BHATTACHARJEE et al., 2008).

O processo da fixação biológica de nitrogênio consiste na redução do N_2 atmosférico (o qual é um recurso ilimitado, pois representa cerca de 78% dos gases presentes na atmosfera) em amônia (NH_3), o qual é assimilado pelas plantas para produção de biomoléculas com nitrogênio em sua composição (BHATTACHARJEE et al., 2008; MITTER et al., 2013; OLIVARES, J. et al., 2013). As bactérias responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio são chamadas de

diazotróficas, sendo que estas bactérias codificam a enzima nitrogenase, a qual é um complexo responsável por catalisar a conversão do gás N₂ em amônia (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

A interação entre planta-solo-bactérias diazotróficas pode ser dividida em três grupos principais: i) bactérias diazotróficas de vida livre, como por exemplo as do gênero *Azotobacter*; ii) bactérias diazotróficas que estabelecem associações endofíticas ou epifíticas, como por exemplo as do gênero *Azospirillum*; iii) bactérias com estreita relação com as plantas provocando a formação de estruturas especializadas de colonização, os nódulos radiculares, como por exemplo os rizóbios (MITTER et al., 2013).

Atualmente a utilização mundial de fertilizantes a base de nitrogênio está na ordem de 113 milhões de toneladas de N (FAOSTAT, 2012). Deste total, estima-se que aproximadamente 65% do N aplicado no solo é perdido do sistema solo-planta através dos processos de emissão gasosa, escoamento, erosão e lixiviação (BHATTACHARJEE et al., 2008). Neste contexto, a utilização da fixação simbiótica de nitrogênio tem grande impacto no que diz respeito a nutrição mineral de plantas como um componente integral do sistema agrícola sustentável, pois estima-se que a fixação biológica de nitrogênio contribua com pelo menos 70 milhões de toneladas por ano mundialmente (MITTER et al., 2013). Além disso, se 15% da área fertilizada utilizando ureia (fertilizante a base de nitrogênio que apresenta a melhor relação custo/benefício) fosse substituída pela utilização de BPCV, seriam economizados cerca de 3,4 bilhões de dólares por safra, além de todos benefícios ambientais derivados da utilização destas bactérias (MONTEIRO, R. A. et al., 2012).

No Brasil, as pesquisas visando a fixação biológica de nitrogênio em gramíneas iniciaram-se com a pesquisadora Johanna Döbereiner, primeiramente através da identificação da ocorrência de bactérias do gênero *Azotobacter* em solos ácidos da Baixada Fluminense. Posteriormente, foi publicado pela referida pesquisadora a identificação da ocorrência de duas novas bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas: *Beijerinckia fluminensis* em cana de açúcar e *Azotobacter paspali* em *Paspalum notatum* cv. *batatais* (BALDANI, J. I.; BALDANI, 2005; DAY; NEVES; DOBEREINER, 1975; DOBEREINER; MALAVOLTA, 1975).

Com a utilização do meio NFb, foi possível fazer o isolamento de duas novas espécies pertencentes ao gênero *Azospirillum*: *A. lipoferum* e *A. brasilense*, que marcaram o aprofundamento das pesquisas com fixação biológica de nitrogênio no Brasil e em outros países

(BALDANI, J. I.; BALDANI, 2005). Entre as décadas de 80 e 90 pesquisas envolvendo bactérias diazotróficas associativas receberam grande atenção, e culminaram na descoberta de duas novas bactérias capazes de colonizar o interior de plantas: *Herbaspirillum seropedicae*, isolado a partir de plantas de milho, sorgo e arroz (BALDANI, J. et al., 1986) e *Gluconacetobacter diazotrophicus*, isolado a partir de plantas de cana de açúcar (CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988).

Atualmente diversos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de elucidar o processo fixação biológica de nitrogênio associada com a promoção do crescimento vegetal por bactérias diazotróficas. Estudos baseados na avaliação de transcritos do complexo da nitrogenase pela técnica de qRT-PCR revelaram a atividade endofítica em diversas gramíneas inoculadas com *G. diazotrophicus* (SEVILLA et al., 2001), *Azoarcus* sp. cepa BH72 em arroz (HUREK et al., 2002), *Herbaspirillum* sp. em arroz (ELBELTAGY et al., 2001) e *Klebsiella* sp. em milho e trigo (CHELIUS; TRIPLETT, 2000; INIGUEZ; DONG; TRIPLETT, 2004; SANTI et al., 2013).

1.3.1.3. Solubilização De Fosfatos

Outro importante papel desempenhado pelas BPCV no que diz respeito a promoção do crescimento de plantas, é a capacidade de solubilização do fosfato presente no solo. O fósforo é um dos elementos mais importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas, e por este motivo é também um dos elementos mais requeridos pelas plantas, sendo que a deficiência deste elemento pode ocasionar sérios danos para o desenvolvimento das plantas, impactando seriamente no rendimento final da cultura (BABALOLA, 2010; HAYAT et al., 2010; MITTER et al., 2013).

Apesar das reservas de fósforo presentes no solo serem relativamente altas, a sua disponibilidade às plantas muitas vezes é limitada. Isso ocorre porque as cargas negativas dos íons de fosfato presentes no solo rapidamente formam complexos minerais insolúveis que não são acessíveis às plantas. Além disso, grandes quantidades de fósforo estão fixadas na matéria orgânica, não sendo disponíveis às plantas (MITTER et al., 2013).

Devido a boa parte do fosfato presente no solo existir nas formas orgânica e inorgânica, inacessíveis as plantas, alguns microrganismos presentes no solo são capazes de transformar o fosfato na forma insolúvel em moléculas solúveis às plantas, principalmente nas formas

iônicas monobásica (H_2PO_4^-) e dibásica (HPO_4^{2-}) (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; HAYAT et al., 2010). Diversos microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) foram relatados como capazes de converter o fosfato insolúvel em formas solúveis através dos processos de acidificação, secreção de ácidos orgânicos ou prótons, e também através de reações de trocas e quelação (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Dentre as BPCV pode-se destacar as pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Serratia* como sendo as bactérias solubilizadoras de fosfato mais significativamente importantes (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; HAYAT et al., 2010). Além disso, Hayat et al., (2010) destaca ainda que os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias com maior capacidade de solubilização de fosfatos.

1.3.2. Mecanismos Indiretos De Promoção Do Crescimento De Plantas E Fitorremediação

1.3.2.1. Indução De Respostas De Resistência Sistêmica Em Plantas

Além de promover o crescimento e desenvolvimento de plantas, seja através do estímulo a produção de hormônios e vitaminas, ou através do processo de fixação biológica de nitrogênio ou realizando a solubilização de fosfatos, as BPCV podem ainda influenciar indiretamente o desenvolvimento das plantas por meio de um processo de “auxílio” ao sistema de defesa da planta contra o ataque de patógenos, através do processo denominado de resistência sistêmica induzida (sigla em inglês, *ISR*). A resistência sistêmica induzida funciona similarmente às propriedades imunoestimulatórias dos produtos probióticos utilizados na alimentação de seres humanos, sendo que em raízes de plantas colonizadas por BPCV ou FPCV, inicia-se um processo eficiente de defesa total da planta contra uma ampla gama de patógenos e até mesmo insetos (ZAMIOUDIS et al., 2013).

Inicialmente utilizada por Van Peer et al., (1991) e Gang et al., (1991), o termo resistência sistêmica induzida corresponde a um estado da planta onde o contato prévio com algum agente indutor, seja ele um aleloquímico, um vírus ou qualquer organismo, faz com que a planta se

torne, não só localmente, mas sistematicamente mais resistente a infecções. Quando a planta é “desafiada” por algum patógeno, sua capacidade de defesa é elevada, havendo uma significativa redução na taxa de desenvolvimento da doença, resultando em um menor número de plantas infectadas ou em menor severidade da doença (MITTER et al., 2013; VAN LOON, 2007). No entanto, é importante destacar que o estabelecimento bem sucedido do processo de resistência sistêmica induzida depende do reconhecimento de alguns fatores bacterianos, tais como lipopolissacarídeos e flagelos bacterianos (BAKKER; PIETERSE; VAN LOON, 2007; FANG et al., 2013).

Diversos exemplos sobre a indução da resistência sistêmica de plantas podem ser encontrados na literatura, por exemplo, em feijão de fava (ou somente fava) (*Vicia faba* L.), foi observado a resistência ao vírus do mosaico amarelo do feijão (BYMV) em plantas inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizobium leguminosarum* (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; ELBADRY et al., 2006). Do mesmo modo, em pepino foi observado resistência a murcha de *Fusarium* (cujo agente causal é *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*) em plantas inoculadas com *Pseudomonas putida* cepa 89B-27 e *Serratia marcescens* cepa 90-166 (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; LIU, L.; KLOPPER; TUZUN, 1995).

Mitter et al., (2013) destaca que apesar dos comprovados efeitos de biocontrole influenciados pelas BPCV no sistema de defesa das plantas, as BPCV podem influenciar a expressão dos hormônios envolvidos no crescimento vegetal, o que resultará no rápido crescimento da planta fazendo com que a planta consiga resistir a pressão de patógeno. Além disso, é importante levar em consideração que os mecanismos de promoção de crescimento das plantas não devem ser considerados isoladamente, mas com certeza, há uma forte interação entre as rotas hormonais afetando positivamente o crescimento das plantas e apresentando reflexos no sistema de defesa das plantas (MITTER et al., 2013).

1.4. *Herbaspirillum seropedicae*

Herbaspirillum seropedicae foi inicialmente isolado em 1984 a partir da rizosfera, raízes lavadas e da superfície estéril de raízes de milho, sorgo e arroz, sendo que inicialmente foi denominado como *Azospirillum seropedicae* (BALDANI, J. I. et al., 1984). Apesar deste grupo de bactérias demonstrar diversas semelhanças fisiológicas e morfológicas ao gênero *Azospirillum*, estudos de homologia entre

DNA:DNA demonstraram a descoberta de um novo gênero denominado *Herbaspirillum*, e *Azospirillum seropedicae* foi renomeado para *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI, J. et al., 1986; BALDANI, J. I.; BALDANI, 2005; CHUBATSU et al., 2012).

O gênero *Herbaspirillum* pertence à classe Betaproteobacteria e compreende atualmente 14 espécies (MONTEIRO, R. A. et al., 2012). Apesar dos microrganismos pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* serem mais conhecidos como bactérias associadas a plantas, a maioria das espécies pertencentes a este gênero (mais precisamente nove espécies) não são encontradas em associação com plantas e vivem em ambientes aquáticos, em solos, solos poluídos ou até em pulmões de pacientes com fibrose cística (MONTEIRO, R. et al., 2012; MONTEIRO, R. A. et al., 2012). Algumas espécies pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (N₂) sob condições microaeróbicas (e por isso são considerados organismos diazotróficos associativos) (BALDANI, J. I. et al., 1996; MONTEIRO, R. A. et al., 2012; RONCATO-MACCARI et al., 2003a).

A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foi uma das primeiras espécies pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* em que foi reportado como microrganismo endofítico capaz de fixar nitrogênio quando em associação com plantas (BALDANI, J. et al., 1986; RONCATO-MACCARI et al., 2003a). A cepa mais estudada é a *H. seropedicae* cepa SmR1, a qual é um mutante da cepa Z78 (ATCC 35893), espontaneamente resistente a estreptomicina, e teve seu genoma completo sequenciado e publicado sob número de acesso no GenBank NC_014323.1 (PEDROSA et al., 2011).

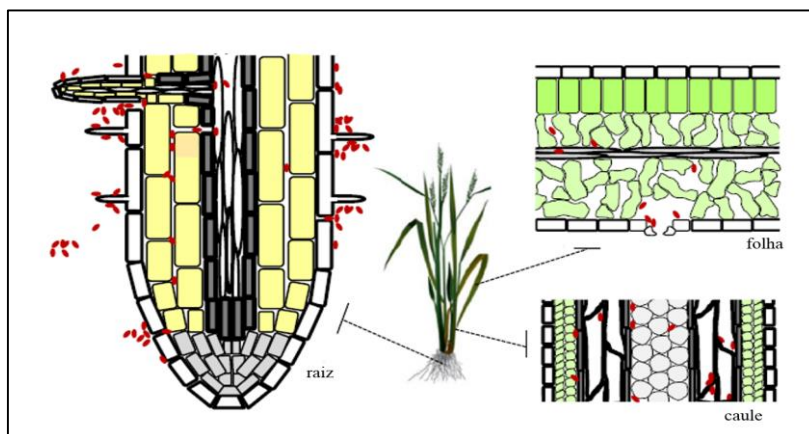
Herbaspirillum seropedicae é uma bactéria diazotrófica que é conhecida por realizar associação com muitas plantas de interesse econômico, particularmente com membros da família Poacea (gramíneas), tais como milho, arroz, sorgo, trigo e cana de açúcar (BALDANI, J. et al., 1986; JAMES, E. K. et al., 1997; OLIVARES, F. L. et al., 1996). Apesar de ser encontrada predominantemente em associação com gramíneas, *H. seropedicae* também pode ser encontrada em associação com leguminosas, como por exemplo o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (SCHMIDT et al., 2011) e também com plantas tropicais de importância econômica como a banana e o abacaxi (CRUZ et al., 2001).

Quando em associação com plantas, *H. seropedicae* pode ser encontrado em raízes, caules e folhas de diversas culturas de interesse econômico (JAMES, E. K. et al., 1997; RONCATO-MACCARI et al., 2003a). A associação entre a bactéria e a planta provavelmente inicia-se

quando a bactéria é atraída pelas raízes da planta através do fornecimento de fontes de carbono por meio das raízes, e em seguida ocorre a adesão da bactéria à superfície radicular e subsequente colonização dos pontos de emergência das raízes laterais e penetração através dos pontos de descontinuidades da epiderme radicular (BALSANELLI et al., 2010; MONTEIRO, R. A. et al., 2012).

A adesão e entrada de *H. seropedicae* SmR1 nos tecidos radiculares das plantas é bastante rápida, sendo que cerca de 30 minutos após a inoculação já pode ser observado a adesão da bactérias em tecidos de milho, sendo que foi possível observar a colonização da planta 5 a 8 dias após a inoculação (MONTEIRO, R. A. et al., 2012). Esse rápido padrão de colonização também foi observado em plantas de feijão comum (SCHMIDT et al., 2011). Após penetrar nos tecidos das raízes, as células de *H. seropedicae* rapidamente ocupam os espaços intercelulares se alastrando até os tecidos do xilema, partindo então para a colonização de outros tecidos e partes da planta, tais como os tecidos do aerênquima de arroz (GYANESHWAR et al., 2002; JAMES, E. K.; OLIVARES, 1998). Na Figura 1.2 é possível visualizar o perfil de adesão e colonização de *H. seropedicae* nas raízes, onde os pontos vermelhos representam as células de *H. seropedicae* que estão aderidas ao longo da raiz de uma planta de arroz. Estabelecida a relação entre a bactéria e a planta, esta se dispersa por toda a planta (Figura 1.2).

Figura 1.2. Adesão e colonização de tecidos vegetais por *H. seropedicae*



Fonte: adaptado de MONTEIRO et al., (2012)

Uma vez concretizada a associação entre a bactéria e a planta, *H. seropedicae* pode promover o crescimento diferencial da planta através da produção e suprimento de fatores de crescimento, tais como fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, proteção do hospedeiro contra patógenos e produção de sideróforos (BALSANELLI et al., 2010; MONTEIRO, R. A. et al., 2012).

Evidências demonstraram que *H. seropedicae* é capaz de fixar nitrogênio atmosférico sob condições limitantes de amônio e oxigênio (BALDANI, J. I. et al., 1996; JAMES, E. et al., 2002). Estudos demonstraram que *H. seropedicae* pode expressar genes *nif* em raízes, caules e folhas, sendo que estudos demonstraram a contribuição desta bactéria para a fixação biológica de nitrogênio por meio da incorporação de $^{15}\text{N}_2$ em arroz e cana de açúcar (GYANESHWAR et al., 2002; JAMES, E. et al., 2002). Além disso, a partir do isolamento do gene *nifA*, diferentes aspectos do metabolismo de nitrogênio realizado por *H. seropedicae* vem sendo estudados (SOUZA; FUNAYAMA; RIGO; PEDROSA, 1991; SOUZA; FUNAYAMA; RIGO; YATES et al., 1991). Grandes avanços vem sendo realizados no que diz respeito aos mecanismos de fixação e metabolismo de nitrogênio por meio de análise molecular, principalmente após o sequenciamento completo do genoma de *H. seropedicae* cepa SmR1 (CHUBATSU et al., 2012; PEDROSA et al., 2011).

Estudos verificaram também que *H. seropedicae* apresenta a capacidade de estimular o crescimento diferencial de plantas através da produção de fitohormônios tais como auxina, giberelinas e etileno (BABALOLA, 2010; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012; MONTEIRO, R. A. et al., 2012). Da mesma maneira, Bastian et al., (1998) relataram a produção de ácido indol-3-acético (IAA) e giberelinas GA_1 e GA_3 por *H. seropedicae*, sendo importante destacar que este resultado pode auxiliar no entendimento dos efeitos benéficos que a bactéria pode ocasionar quando em associação com plantas de interesse econômico. Do mesmo modo, Brusamarello-Santos et al., (2012) verificaram que a expressão dos genes associados a resposta dos hormônios auxina e etileno são regulados pela bactéria quando ocorre a colonização de plantas de arroz pela bactéria.

Através do sequenciamento completo de *H. seropedicae* SmR1, verificou-se que a bactéria expressa o gene *acdS*, o qual está relacionado com a expressão da enzima ACC deaminase (enzima responsável pelo estímulo ao crescimento vegetal através da diminuição dos níveis de etileno na planta) (PEDROSA et al., 2011). O sincronismo entre a expressão dos hormônios IAA e ACC por *H. seropedicae* é um

mecanismo pelo qual ocorre a promoção do crescimento vegetal por este microrganismo (MONTEIRO, R. A. et al., 2012).

Diversos estudos foram conduzidos com o objetivo de elucidar o envolvimento de *H. seropedicae* com plantas de interesse econômico. Dentre estes estudos, destaca-se o trabalho realizado visando analisar o perfil das proteínas envolvidas na interação *H. seropedicae* e extrato de cana de açúcar. Neste trabalho verificou-se a expressão 16 proteínas diferencialmente expressas, sendo que destas, uma proteína foi expressa exclusivamente na presença de extrato de cana, 7 foram expressas exclusivamente no controle, 5 apresentaram expressão aumentada na presença de extrato de cana e 3 com expressão diminuída na presença de 5% de extrato de cana de açúcar. Após a validação das proteínas diferencialmente expressas por qRT-PCR, verificou-se que estas proteínas estão envolvidas em mudanças metabólicas e adaptações da parede celular da bactéria, sendo considerados como uma preparação para estabelecer a interação com a superfície radicular da planta (CORDEIRO et al., 2013).

Apesar de *H. seropedicae* realizar associação com diversas culturas de interesse econômico, os mecanismos de infecção e colonização ainda não estão completamente conhecidos, e o maior entendimento desse processo é necessário para melhorar a utilização desta e de outros organismos endofíticos como promotores de crescimento vegetal. Deste modo, métodos que identifiquem e localizem a bactéria no interior das células das plantas são extremamente necessários (BALSANELLI et al., 2010; CORDEIRO et al., 2013; MONTEIRO et al., 2008; VARGAS et al., 2012).

Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas e/ou metodologias capazes de auxiliar na elucidação dos processos de estabelecimento da associação simbiótica entre microrganismos e plantas são necessários. Apesar de existirem diversas metodologias capazes de identificar as bactérias associadas ao interior dos tecidos de plantas, poucos métodos existentes atualmente são capazes de identificar rápida e confiavelmente as BPCV no interior de plantas (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010; MONTEIRO et al., 2008). Dentre os métodos disponíveis atualmente que permitem a rápida e confiável identificação de microrganismos, pode-se destacar os métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como um método capaz de identificar células de microrganismos, e recentemente a utilização da técnica de PCR em Tempo Real (PCR quantitativa) surgiu como uma importante ferramenta para identificação e quantificação da presença de microrganismos.

1.5. PCR QUANTITATIVA (qPCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica onde ocorre a amplificação *in vitro* de sequências específicas de ácidos nucleicos (MULLIS, 1990; MULLIS; FALOONA, 1987). A partir da PCR convencional (ou qualitativa), foi desenvolvida a PCR em Tempo Real, a qual representou um salto tecnológico, pois abriu novas e poderosas aplicações para a pesquisa, devido a sua grande sensibilidade de detecção e a possibilidade de monitorar em tempo real a geração dos produtos da PCR (ANDERSEN et al., 2006; LIPP et al., 2005; VALASEK; REPA, 2005).

A PCR em Tempo Real baseia-se na PCR convencional, a qual utiliza a capacidade da enzima DNA polimerase em amplificar fragmentos específicos de DNA através de pequenas sequências específicas de oligonucleotídeos que irão atuar como iniciadores. A primeira enzima DNA polimerase utilizada foi a *Taq* DNA polimerase (proveniente da bactéria *Thermus aquaticus*), sendo que esta é utilizada por dois motivos: i) pode gerar novas cópias de DNA utilizando uma fita molde; ii) é resistente a altas temperaturas. Este último atributo é extremamente necessário, pois a cada rodada de amplificação, a temperatura é inicialmente elevada a aproximadamente 95 °C (temperatura de abertura das fitas de DNA), em seguida diminui-se a temperatura para haver o anelamento dos iniciadores e finalmente a etapa de elongação onde serão adicionados os nucleotídeos e uma nova fita de DNA será criada (VALASEK; REPA, 2005).

Na PCR convencional, somente a concentração final do DNA amplificado poderá ser observada através da utilização de um corante fluorescente que se liga a fita dupla de DNA (por exemplo, brometo de etídeo). Já na PCR em Tempo Real, a concentração do fragmento amplificado é monitorada através dos ciclos de amplificação por meio de novos reagentes fluorescentes que se ligam ao fragmento, e ao emitir fluorescência esta é captada pelo equipamento, permitindo monitorar a concentração do fragmento em tempo real (VALASEK; REPA, 2005; ZHANG, T.; FANG, 2006). Os reagentes fluorescentes mais utilizados na PCR em Tempo Real são os corantes intercalantes e as sondas de hibridização (LIPP et al., 2005).

Os corantes intercalantes (por exemplo, SYBR Green) se ligam inespecificamente à dupla fita de DNA, não se ligando à fita simples. Assim, durante a extensão dos iniciadores pela DNA polimerase, as moléculas de fluoróforo ligam-se ao DNA que está sendo sintetizado. O aumento da quantidade do DNA fita dupla que é sintetizado resulta em

um aumento do sinal fluorescente, que é medido ao final de cada ciclo de extensão, sendo observada em tempo real (MARKOULATOS et al., 2004; VALASEK; REPA, 2005; ZHANG, T.; FANG, 2006). Quando se utilizam corantes intercalantes, a fluorescência originada pode ser proveniente de produtos específicos ou inespecíficos presentes na reação. No entanto, através da análise da curva de derivatização da temperatura fusão (*melting*), pode-se distinguir produtos específicos e não-específicos por meio da temperatura de fusão (*melting*) específica de cada fragmento amplificado (ANDERSEN et al., 2006).

Para evitar os problemas associados com a detecção de amplificações não específicas decorrentes da utilização de corantes intercalantes, pode-se adicionar uma ou mais sondas fluorescentes ao mix da reação. O sistema de sonda intercalante (por exemplo, TaqMan) vale-se da atividade exonucleásica 5'-3' da DNA polimerase para produzir um sinal fluorescente. Esta sonda é constituída por um oligonucleotídeo, que contém uma sequência de nucleotídeos homóloga à sequência específica de uma das fitas do amplicon gerado, sendo que a fluorescência será detectada apenas se o fragmento for amplificado (ANDERSEN et al., 2006). A sonda é marcada na extremidade 5' com um corante *reporter* fluorescente de alta energia e um *quencher* de fluorescência na extremidade 3'. Enquanto a sonda permanece intacta, a proximidade do *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo *reporter*, pela transferência de energia. Na presença do alvo, durante a etapa de anelamento, a sonda se anela em uma das fitas do DNA amplificado. Durante a etapa de extensão, a DNA polimerase, que apresenta atividade 5'-3' exonuclease, degrada a sonda, ocorrendo liberação do corante *reporter* e emissão do sinal fluorescente. A degradação da sonda da fita do DNA alvo permite a continuação da extensão do iniciador até o final. Em cada ciclo de PCR outras moléculas do *reporter* vão sendo liberadas, ocorrendo assim um aumento da intensidade da fluorescência, que é proporcional à quantidade do produto de amplificação produzido (ANDERSEN et al., 2006; HEID et al., 1996; ZHANG, T.; FANG, 2006).

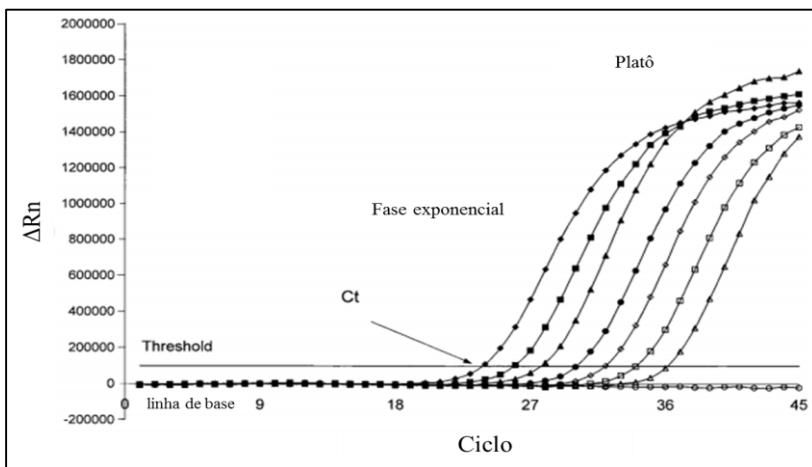
A PCR em Tempo Real possui as mesmas 3 etapas que a PCR convencional (desnaturação-anelamento-extensão), sendo possível distinguir 3 fases distintas ao longo dos ciclos:

- 1ª fase: fase “lag”, com flutuação correspondendo ao sinal do ruído de fundo (*background*). Nesta fase ainda não houve amplificação suficiente, sendo assim, não houve clivagem suficiente do corante *reporter* para detecção da fluorescência.

- 2ª fase: fase exponencial, onde a quantidade de produtos de amplificação dobra a cada ciclo, com aumento contínuo do sinal fluorescente.
- 3ª fase: formação de um platô, esta é a fase final da reação, quando não há aumento do número de produtos de amplificação, por consequência, não há aumento de sinal fluorescente.

Na Figura 1.3 é possível visualizar as três fases da PCR em Tempo Real.

Figura 1.3. Gráfico de amplificação da PCR em Tempo Real.



Fonte: adaptado de GIULIETTI *et al.*, (2004)

A quantificação na PCR em Tempo Real ocorre na fase exponencial, pois nessa fase é gerado um acúmulo de produtos amplificados, com consequente aumento da emissão de fluorescência. O ciclo onde o sinal fluorescente emitido ultrapassa o limiar de detecção de sinal permite inferir a concentração inicial do DNA alvo para cada amostra. O limiar de detecção (*threshold*) é definido dentro da fase exponencial, no ponto em que as réplicas sejam mais coincidentes (HEID *et al.*, 1996).

O ciclo *threshold* (Ct) é o ciclo em que a curva de amplificação de cada DNA alvo cruza a linha *threshold* (ou limiar de detecção de

sinal) (Figura 1.3). Quanto maior for a quantidade inicial do alvo, mais cedo ocorre um aumento significativo da fluorescência e mais baixo será o valor de Ct (ANDERSEN et al., 2006).

Com o advento da PCR em Tempo Real como uma importante ferramenta para avaliação de DNA e RNA, uma ampla gama de trabalhos foram realizados em interação planta-microrganismo, sendo que estes vão desde a identificação da expressão diferencial de genes que estão sendo expressos em plantas associadas a microrganismos (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012; CORDEIRO et al., 2013; GALISA et al., 2012; VARGAS et al., 2012), à identificação e quantificação de microrganismos em diversas matrizes (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010; KANG et al., 2012).

Recentemente, com o advento da utilização de microrganismos promotores de crescimento associados a plantas, tem aumentado a demanda por metodologias capazes de monitorar a presença destes no interior dos tecidos vegetais. Metodologias clássicas baseadas no plaqueamento de soluções diluídas ou através da contagem do número mais provável (NMP) de culturas inoculadas são técnicas que apresentam difícil reprodutibilidade, principalmente quando se está trabalhando com ambientes naturais, além disso estes são muito trabalhosos e consomem muito tempo para obter resultados, não sendo aplicáveis para o rápido monitoramento de experimentos realizados em larga escala (VON FELTEN; DÉFAGO; MAURHOFER, 2010). A necessidade de metodologias para realizar o rápido e confiável monitoramento de microrganismos em ambientes naturais e *in vitro* tem levado ao emprego da PCR em Tempo Real com o objetivo de identificar e quantificar, visto que este é um método que apresenta alta especificidade, sensibilidade e velocidade para realizar a detecção da microrganismos, sejam associados a plantas (como por exemplo as BPCV), ou seja através da quantificação de microrganismos causadores de doenças em plantas (fitopatógenos) (COUILLEROT, O. et al., 2010; SORENSEN et al., 2009; VON FELTEN et al., 2010).

No que diz respeito a detecção e quantificação de BPCV, pode-se destacar o trabalho desenvolvido por Shime-Hattori *et al.*, (2011) onde iniciadores para identificação de isolados do gênero *Azospirillum* foram desenvolvidos para PCR convencional. Couillerot *et al.*, (2010) desenvolveram iniciadores para realizar a quantificação via PCR em Tempo Real do inoculante baseado em *Azospirillum lipoferum* cepa CRT1 na rizosfera e em plântulas de milho. Timmusk *et al.*, (2009) desenvolveram iniciadores para detecção e quantificação da BPCV *Paenibacillus polymyxa* encontrado na rizosfera de plantas selvagens de

cevada. Com relação a detecção de fitopatógenos, destaca-se o trabalho desenvolvido por Raj *et al.*, (2012) de um método para identificar a presença do fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* em plantas infectadas de inhamo através de *nested* PCR. Da mesma maneira, Kang *et al.*, (2012) realizaram a detecção do patógeno de plantas de arroz *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* através da técnica de PCR em tempo real.

Além disso, a PCR em tempo real é uma importante ferramenta para quantificação de amostras de plantas que foram submetidas ao processo de congelamento, como por exemplo, amostra provenientes de campos de cultivo ou amostras armazenadas por longos períodos. Nestes casos, análise utilizando o processo de contagem por plaqueamento é inviável, sendo a metodologia da PCR em tempo real a mais adequada.

Deste modo, a PCR em tempo real se mostra como uma importante ferramenta para futuros estudos envolvendo a interação entre plantas e microrganismos.

CAPÍTULO 2

QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO DA BACTÉRIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO VEGETAL *Herbaspirillum* *seropedicae* CEPA SmR1 EM RAÍZES DE MILHO

Artigo publicado:

PEREIRA, T.P.; AMARAL, F.P.; DALL’ASTA, P.; BROD, F.C.A.; ARISI, A.C.M. Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. **Molecular Biotechnology**. 2014. DOI: 10.1007/s12033-014-9742-4

2. REAL TIME PCR QUANTIFICATION OF THE PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA *HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE* STRAIN SMR1 IN MAIZE ROOTS

ABSTRACT

The plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 is an endophytic diazotroph found in several economically important crops. Considering that methods to monitor the plant-bacteria interaction are required, our objective was to develop a real-time PCR method for quantification of PGPB *H. seropedicae* in the rhizosphere of maize seedlings. Primer pairs were designed and their specificity was verified using DNA from 12 different bacterial species. Ten standard curves of qPCR assay using HERBAS1 primers and 10-fold serial dilutions of *H. seropedicae* SmR1 DNA were performed and PCR efficiency of 91% and correlation coefficient of 0.99 were obtained. *H. seropedicae* SmR1 limit of detection (LOD) was 10^1 copies (corresponding to 60.3 fg of bacterial DNA). qPCR assay using HERBAS1 was used to detect and quantify *H. seropedicae* strain SmR1 in inoculated maize roots, cultivated *in vitro* and in pots, harvested 1, 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI). The estimated bacterial DNA copy number per gram of root was in the range 10^7 - 10^9 for plants grown *in vitro* and it was around 10^6 for plants grown in pots. Primer pair HERBAS1 was able to quantify *H. seropedicae* SmR1 and this assay can be useful for monitoring plant-bacteria interaction.

Keywords: *Herbaspirillum*, plant-bacteria interaction, corn, maize, qPCR, diazotroph

2.1. INTRODUCTION

Plant growth promoting bacteria (PGPB) are a heterogeneous group of free-living soil bacteria associated with the plant rhizosphere, that can contribute, direct or indirectly, to plant growth and can increase the productivity of crops, vegetables and other plants of economic importance (BAL et al., 2013; FAN et al., 2011). Indirectly PGPB can promote the plant growth through antagonisms against phytopathogenic microorganisms (FAN et al., 2011; LIU, F. C. et al., 2013). Directly PGPB can promote plant growth by phosphate solubilization, providing

nitrogen fixation and phytohormones production (BAL et al., 2013; LIU, F. C. et al., 2013; RASHID; CHARLES; GLICK, 2012).

The PGPB *Herbaspirillum seropedicae* is a Gram-negative diazotroph that belongs to the class of the β -proteobacteria (BALDANI, J. et al., 1986). The genus *Herbaspirillum* comprises 13 species, most of which are plant colonizers, but can occasionally be found in other habitats (MONTEIRO, R. et al., 2012). *H. seropedicae* strain SmR1 is a spontaneous streptomycin resistant mutant of the strain Z78 (ATCC 35893) and its complete genome was published recently, GenBank accession number NC_014323.1 (PEDROSA et al., 2011). *H. seropedicae* has been known for establishing interaction with important economic crops such as rice, maize, wheat and sugarcane (ELBELTAGY et al., 2001; GYANESHWAR et al., 2002; JAMES, E. K.; OLIVARES, 1998; TAULE et al., 2012). The association of the bacteria with plants probably starts with the attraction of the bacteria to the roots, as they provide carbon sources to the bacteria, followed by attachment and infection on the roots, and subsequent colonization of the plant tissues (BALSANELLI et al., 2010; MONTEIRO, R. A. et al., 2012). Evidence showed that *H. seropedicae* promote differential plant growth by fixing nitrogen under conditions of ammonium and oxygen limitation (BALDANI, J. I. et al., 1996; JAMES, E. et al., 2002), and promote the beneficial regulation of phytohormones like auxins, gibberellins and ethylene (BASTIAN et al., 1998; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2012; MONTEIRO, R. A. et al., 2012). Nevertheless, the mechanisms of infection and colonization are not completely understood (BALSANELLI et al., 2010; MONTEIRO et al., 2008) and the identification of endophytic bacteria within the host plant is a necessary step to monitor the colonization. Despite the need for techniques that allow identification of the bacteria on internal plant tissues, few methods are actually available to identify rapidly and reliably the PGPB within the host plant (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010; MONTEIRO et al., 2008).

In order to monitor the establishment of the presence and colonization of the PGPB on field conditions or in association with crops, molecular methods based on PCR have been successful in tracking and identifying isolates of the genus *Azospirillum* (SHIME-HATTORI et al., 2011), and the inoculant *Azospirillum lipoferum* strain CRT1 (BAUDOIN et al., 2010). Also, the use of BOX PCR was employed for the evaluation of plant growth promoting potential of diazotrophs on deep water rice (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001) and to determine the *Azospirillum* genetic diversity in *Pennisetum*

purpureum (VIDEIRA et al., 2012). Real time PCR method has been successfully applied for bacterial DNA quantification of the PGPB *Azospirillum lipoferum* strain CRT1 in maize seedlings and rhizosphere (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010) and *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wild barley (TIMMUSK et al., 2009). PCR method is employed to monitor phytopathogens in crops. For example, anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* was detected in infected plant material of yam using nested PCR (RAJ et al., 2012) and the progression of rice blast disease, caused by *Magnaporthe oryzae*, was quantified using real time PCR (SU'UDI et al., 2013). The aim of this study was to develop a real time PCR method for quantification of the PGPB *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots.

2.2. MATERIAL AND METHODS

2.2.1. Bacterial strains

Herbaspirillum seropedicae strain SmR1 (strain Z78 ATCC 35893 Sm^R) and other *Herbaspirillum* strains used in this work were routinely grown in orbital shaker (120 rpm) at 30 °C in 30 mL NFbHPN medium supplemented with 5 mg/L malic acid (KLASSEN et al., 1997). Optical density (OD) of bacterial cell culture was measured at 600 nm using Hitachi U2910 Spectrophotometer. A correlation was obtained between the optical density and the number of colonies by plating serially diluted cell cultures in NFbHPN agar plates (Table S1). *Azospirillum brasilense* strain FP2 was grown under the same conditions, except that NFbHPN medium was supplemented with 5 mg/L sodium lactate. *Rhizobium* (DE SOUZA et al., 2013), *Microbacterium* and *Pseudomonas* were grown in Luria-Bertani medium (BERTANI, 1951) at 28 °C. *E. coli* (ATCC 25922) was grown in Brain-Heart Infusion broth (Oxoid) while *B. subtilis* (ATCC 6051) and *B. cereus* (ATCC 14579) were grown in nutrient broth (Oxoid) at 37 °C.

2.2.2. Germination, inoculation and growth of seedlings

Seeds of *Zea mays* (variety Dekalb240) were surface sterilized in laminar flow cabinet by washing three times with autoclaved ultrapure water, followed by 70% ethanol for 3 min and shaken in 2% sodium hypochlorite and 2.5% Tween 20 for 30 min (RONCATO-MACCARI

et al., 2003a). Seeds were then washed three times with autoclaved ultrapure water by gentle shaking, transferred to plates containing 0.8% agar-water and maintained for 3 days in growth chamber at a temperature of 25 °C, in the dark, for germination.

For inoculation of the seedlings, a bacterial culture, OD₆₀₀ 0.8 corresponding to $\sim 10^8$ colony formation unity (CFU/mL), was diluted in medium NFb malate (1:1000) (KLASSEN et al., 1997). After preparing the cell suspension, thirty germinated seedlings were incubated in 30 mL of $\sim 10^5$ bacterial cells.mL⁻¹ of *H. seropedicae* SmR1 in NFb malate medium without nitrogen source in an orbital shaker for 30 min at 30 °C and 80 rpm (BALSANELLI et al., 2010). Control seedlings were Mock-inoculated under the same conditions. For seedlings grown *in vitro*, inoculated seedlings were washed in autoclaved 0.9% saline buffer for 1 min and placed in the glass tubes containing plant medium solution (EGENER; HUREK; REINHOLD-HUREK, 1999). Seedlings from each treatment were grown in a controlled-environmental chamber, placed side-by-side, for 10 days (16h photoperiod at 150 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 25 °C light/23 °C dark and 40% humidity). For seedlings grown in pots, inoculated seedlings were washed with 0.9% saline solution and then transferred to pots containing sterilized sand with Hoagland's solution (EGENER et al., 1999) without nitrogen. They were maintained in a controlled growth chamber adjusted to 12 h photoperiod, photosynthetic active radiation of 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperature of 25 °C, watered daily. Hoagland's solution without nitrogen was added over again 7 days after inoculation.

The results reported represent three independent experiments (biological replicates) performed in different periods of time. Maize seedlings from each treatment were randomly collected on the 1st, 4th, 7th and 10th day after inoculation (DAI).

2.2.3. DNA extraction protocols

Maize genomic DNA was extracted and purified from frozen roots using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol, with a previously step of lysis treatment: samples were incubated for 15 min at 65 °C with a CTAB buffer (20 g/L CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1 M Tris buffer, 20mM Na₂EDTA, pH 8.0) instead of incubation with the AP1 buffer supplied in the kit. Thus, 20 μL of proteinase K (20 mg/mL) was added to each sample and samples were incubated for 15 min at 65 °C (DINON et al., 2011). For bacterial

genomic DNA extraction, 2 mL medium aliquots containing 10^8 cells/mL were centrifuged (6000 g, 3 min, 4 °C) and pellets were stored at -80 °C until DNA extraction. Pellets were suspended in 100 µL of ultrapure water, frozen at -80 °C for 20 min, and immediately heated in boiling water (100 °C) for 10 min. Cell suspension was cooled to room temperature, centrifuged (13000 g, 10 s) and supernatant was used for DNA extraction using Wizard[®] Genomic DNA purification kit (Promega[™], Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. DNA concentration was determined on a Thermo Scientific NanoDrop[™] 2000 spectrophotometer (Wilmington, DE, USA) with measurements at 260 and 280 nm.

2.2.4. Primer design

In order to select a specific DNA sequence for a *H. seropedicae*-specific qPCR assay, an extensive BLAST search was performed using the complete genome of the microorganism (GenBank accession number NC_014323.1 (PEDROSA et al., 2011)). Two regions, found as a single copy in the *H. seropedicae* genome, were selected and their specificity was confirmed by *in silico* alignment analyses: Bacteriophage Tail Fiber Protein (GenBank accession CP002039.1|216307-217431) and Outer Membrane Protein (Porin) (GenBank accession CP002039.1|194590-195762). Sets of primers were designed using Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) and two primer pairs were selected, HERBAS1 and HERBAS2 (Table 2.1), each one targeting one specific sequence. Primers were synthesized by IDT (Coralville, IA, USA).

Table 2.1. Primers used for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and maize (*Zea mays*) PCR detection and real time PCR quantification (qPCR).

Primer	Sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)	Reference
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1			
HERBAS1	TTTCGCGGTAGGCGATCA	76	This study
HERBAS1	GAGCAATTGACCGGCAAGAC		
HERBAS2	GGAAGCTGGTTTCTCCAATGATA	63	This study
HERBAS2	AACAGGGTGTTGCTGGTCTTG		
<i>Zea mays</i>			
ZM1	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	79	(DINON et al., 2011)
ZM1	GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT		

2.2.5. Real-time PCR quantification

In order to detect and quantify the presence of *H. seropedicae* SmR1 in inoculated maize roots, primers HERBAS1 and HERBAS2, which amplify fragments of 76 bp (theoretical $T_m = 85^\circ\text{C}$) and 63 bp (theoretical $T_m = 82^\circ\text{C}$), respectively, were tested by qPCR. Also, primer ZM1 (hmg), which amplifies a fragment of 79 bp, was used to quantify maize DNA in the tested samples (DINON et al., 2011). Quantitative real time PCR was performed in ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Amplification reactions were carried out in a final volume of 25 μL containing 12.5 μL of 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 100 nM of each primer (HERBAS1, HERBAS2, ZM1), water and template DNA. The amplification protocol consisted of an initial incubation at 50°C for 2 min, 95°C incubation for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. All real-time PCR runs were analyzed using automatic software settings. Maize inoculated samples were tested in triplicate and control samples in duplicate. All maize samples were tested by qPCR at a final concentration of 50 ng DNA per reaction.

2.2.6. Construction of standard curves

Standard curves were prepared with serial dilutions of genomic DNA isolated from *H. seropedicae* SmR1 and maize roots. The number of genome copies were calculated on the basis of the size of the *H. seropedicae* SmR1 (GenBank accession number NC_014323.1) (PEDROSA et al., 2011) genome (5.51 Mbp) using the Avogadro's constant (6.023×10^{23}) and the molecular weight of DNA (660 Da/bp). Genomic DNA was 10-fold serially diluted in ultra-pure water to final concentrations ranging from 10^6 to 10^0 genome copies per 2 μL , equivalent to concentrations of 6.03 ng to 6.03 fg. Each standard curve run was analyzed in three different PCR runs in duplicate. The Ct versus log CFU of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 was also estimated using genomic DNA extracted from the bacteria. Ten times serial dilutions of DNA extracted from *H. seropedicae* SmR1, grown until stationary growth phase, was performed. The corresponding CFU per PCR well was calculated based on plate counts. The maize copy numbers were calculated as described above considering the size of 2.3 Gbp (SCHNABLE, 2012) and one diploid genome, 2C value of 5.6 pg

(GAUT et al., 2000). Four 10-fold serial diluted concentrations ($56 - 0.0056$ ng per reaction) of maize genomic DNA were used for the preparation of standard curves, ranging from 10^4 to 10^0 genome copies per reaction. Bacterial DNA standard curves were also prepared in the presence of a background DNA of maize roots (6 ng per reaction) isolated from control seedlings. Genomic DNA isolated from inoculated maize root was also 10-fold serially diluted in ultra-pure water to final concentrations equivalent to $10^6 - 10^0$ bacterial genome copies per reaction. Standard curves for each DNA dilution were generated by plotting the cycle threshold (Ct) value versus the logarithm of bacterial genome copy number. Amplification efficiencies were determined using the equation $E = 10^{(-1/s)} - 1$, where E is the efficiency and s is the slope obtained from the standard curve.

2.3. RESULTS

2.3.1. Primer specificity

Primer pairs HERBAS1 and HERBAS2 were designed based on the genome of *H. seropedicae* strain SmR1 (Table 2.1). *In silico* analyses using BLAST alignment tools showed no match for both HERBAS primer pairs, except for the expected *H. seropedicae* sequences. Specificity tests were conducted using DNA extracted from *H. seropedicae* SmR1 and several other *Herbaspirillum* species and other bacterial genera in order to verify if primer pairs HERBAS1 and HERBAS2 were able to detect exclusively *H. seropedicae* SmR1. When qPCR was conducted using HERBAS2 primers, amplicons with similar T_m were observed for all *Herbaspirillum* species (Table 2.2). Because HERBAS2 presented positive detection with similar T_m for species other than *H. seropedicae*, it was not used for the quantification experiments.

Table 2.2. Ct and Tm values generated by qPCR specificity assay using primers HERBAS1 and HERBAS2 and DNA extracted from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 or other bacteria as template DNA

Template DNA ^a	HERBAS1				HERBAS2			
	Mean Ct	Tm1	Tm2	Tm3	Mean Ct	Tm1	Tm2	Tm3
<i>H. seropedicae</i> SmR1	13.37	83.28	-	-	16.21	79.10	-	-
<i>H. hiltneri</i>	32.76	67.26	76.46	-	36.47	78.58	-	-
<i>H. huttiense</i>	30.23	78.60	-	-	35.51	78.80	64.70	-
<i>H. lusitanum</i>	30.42	74.57	84.42	-	36.56	78.64	-	-
<i>H. rubrisubalbicans</i>	25.59	72.41	83.41	88.47	29.98	78.85	-	-
<i>H. frisingense</i>	29.62	72.17	79.11	86.92	33.75	78.83	65.05	-
<i>A. brasilense</i>	34.36	68.61	78.18	84.55	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	n.e.	n.e	n.e	n.e
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	n.e	n.e	n.e	n.e
<i>E.coli</i>	39.32	63.74	76.46	81.20	n.e	n.e	n.e	n.e
<i>Rhizobium</i> sp.	36.56	67.01	78.37	84.14	n.e	n.e	n.e	n.e
<i>Microbacterium</i> sp.	36.20	64.76	78.46	85.72	n.e	n.e	n.e	n.e
<i>Pseudomonas</i> sp.	31.65	69.57	86.96	-	n.e	n.e	n.e	n.e

^a Samples were analyzed at a final concentration of 6 ng DNA per reaction for all samples (n=4).

(-) = Ct or Tm not detected

n.e. = samples not evaluated by qPCR.

Regarding qPCR using HERBAS1 primers and annealing temperature of 60 °C, DNA samples from *H. seropedicae* presented an amplicon with calculated T_m of 85 °C and observed T_m of 83.28 °C at a C_t value of 13.37 (6 ng of template DNA). DNA samples from other *Herbaspirillum* species presented non-specific amplifications with different T_m at higher C_t values (Table 2.2, Figures S1, S2 and S3). DNA samples from the other bacterial genera presented amplifications at late C_t values (C_t of 25 for *H. rubrisubalbicans* and $C_t > 30$ for other species). DNA from *Bacillus* genus did not present amplification (Table 2.2). qPCR using HERBAS1 primers was also performed with high annealing temperatures, 61 °C and 63 °C and similar results were obtained (Table S2).

2.3.2. qPCR reaction parameters for *H. seropedicae* SmR1 quantification

The reaction parameters (efficiency, slope and correlation coefficient) of the qPCR assay using HERBAS1 and annealing temperature of 60 °C were determined based on standard curves obtained from 10-fold serial dilution of three different extracts of bacterial DNA isolated from *H. seropedicae* SmR1. The reaction parameters were calculated by plotting the C_t values against the \log_{10} of the genome copy numbers (Figure 2.1-A) and \log_{10} corresponding CFU of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (Figure 2.1-B). Ten independent standard curves were determined for HERBAS1 (Table 2.3). The standard curves presented a suitable linear correlation ($R^2=0.99$) and a mean slope value of -3.54, corresponding to a PCR efficiency of 91%. The reaction parameters (efficiency, slope and correlation coefficient) of the qPCR assay using HERBAS1 and annealing temperature of 61 °C or 63 °C were also determined based on bacterial DNA serial dilution curves. For both conditions, the efficiency decreased to unacceptable values, lower than 90% (Table S3), thus all following qPCR runs were performed at annealing temperature of 60 °C.

Figure 2.1. qPCR standard curves for *Herbaspirillum seropedicae* quantification generated using 3 DNA extractions from *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 as template DNA and HERBAS1 primers. A) Ct versus log DNA copy number. Average Ct \pm SD (n = 21). B) Ct versus log CFU (n = 6).

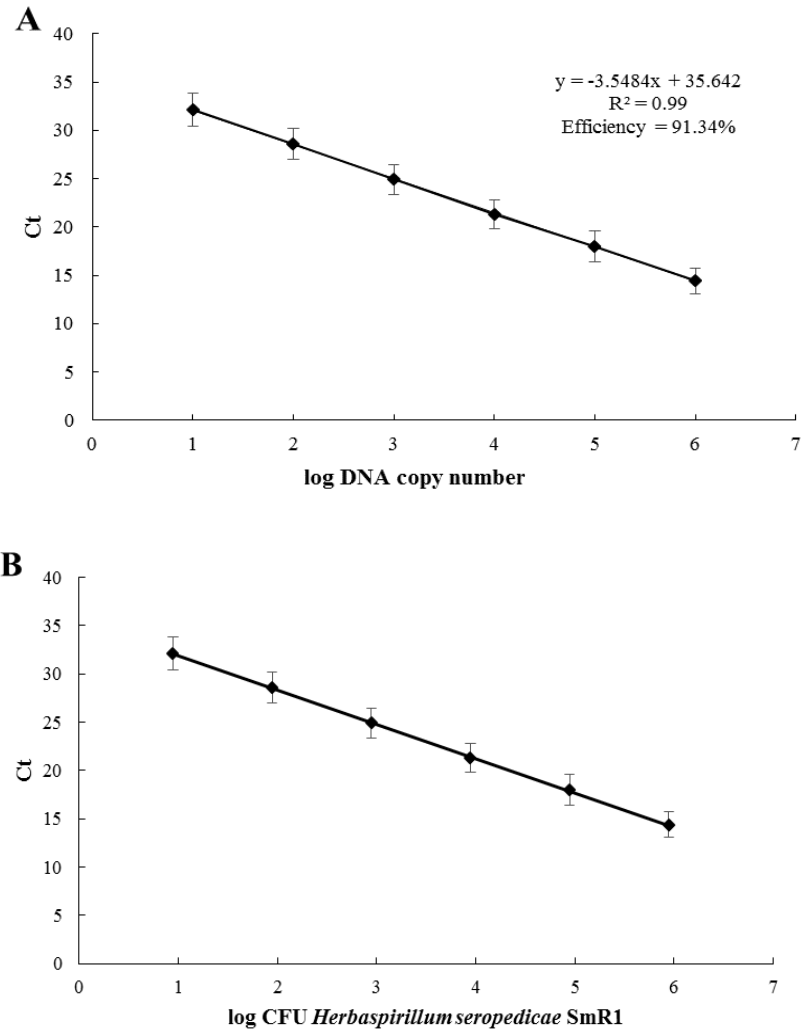


Table 2.3. Parameters of qPCR standard curves for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 detection using HERBAS1 primers and bacterial DNA serial dilution.

qPCR run	DNA sample	Efficiency (%)	Slope	R ²
1	A	99	-3.34	0.99
1	B	93	-3.48	0.99
1	C	93	-3.49	0.99
2	A	88	-3.63	0.99
2	B	96	-3.41	0.99
2	C	90	-3.58	0.99
3	A	85	-3.74	0.99
3	B	91	-3.55	0.99
3	C	85	-3.74	0.99
4	B	92	-3.51	0.99
Mean		91	-3.54	0.99
SD		4.47	0.13	0
CV (%)		4.90	3.71	0.00

The limit of detection (LOD) for *H. seropedicae* SmR1 was 10¹ genome copies (corresponding to 60.3 fg), although 10⁰ genome copies were detected in 18 out of 21 reactions (mean Ct = 35.50). This quantity of one copy was not detected in all reactions, so it was not used for the construction of the standard curve.

Repeatability standard deviation (%RSD_r) of the Ct values from ten real-time PCR runs was calculated and all values presented below 10%. The highest %RSD_r value was 9.19%, for 10⁶ genome copies and the lowest was 5.34% for 10¹ genome copies (Table 2.4). The relative

repeatability standard deviation (%RSD_r) was determined from three DNA extracts (A, B and C) of genomic of *H. seropedicae* SmR1 in different days (Table 2.5) and results showed values below 10%. In addition, the influence of the DNA extraction was also determined by calculating the %RSD_r from results obtained for three independent PCR runs (R1, R2 and R3), using three different DNA extracts from *H. seropedicae* SmR1 (Table 2.6) and results were below 15%. In order to evaluate the effect of background maize DNA in qPCR quantification of *H. seropedicae* SmR1, amplification efficiencies were determined by the construction of standard curves of serial dilution of bacterial DNA in the presence of a constant amount of DNA extracted from maize roots (6 ng per well). In addition, a 10-fold serially diluted standard curve of DNA extracted from inoculated maize roots was analyzed (Table 2.7). When amplification efficiencies for *H. seropedicae* detection were determined using DNA samples extracted from inoculated maize roots, values ranged from 108 to 118% (Table 2.7). When serial dilutions of the 3 different bacterial DNA extracts were prepared in the presence of background maize DNA isolated from control maize root (non-inoculated), amplification efficiencies were respectively 95, 99 and 103% (Table 2.7). In presence of background maize DNA, the limit of detection of *H. seropedicae* DNA was near 10⁰ copy (mean Ct = 33.46). Using maize DNA as template, no amplification was detected.

Table 2.4. Comparison of Ct values obtained for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 qPCR assay using HERBAS1 primers and ten independent serial dilutions of three bacterial DNA extracts.

Copy number	Ct										Mean		
	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C	4B	Ct	SD	%RSD _r
10 ⁶	13.87	16.57	13.36	13.43	15.89	13.32	13.90	15.57	12.96	15.19	14.41	1.32	9.19
10 ⁵	15.71	19.88	16.66	16.80	20.01	17.55	17.58	19.55	16.61	19.24	17.96	1.60	8.91
10 ⁴	19.00	23.22	19.87	20.66	23.07	20.62	21.11	22.74	20.23	22.74	21.33	1.51	7.06
10 ³	22.43	26.80	23.29	24.20	26.80	24.13	24.60	26.44	23.90	26.37	24.90	1.59	6.38
10 ²	26.14	30.40	27.15	27.69	30.55	28.01	28.12	30.22	27.71	30.02	28.60	1.57	5.49
10 ¹	29.41	33.86	30.54	31.23	34.62	31.16	32.23	33.73	31.77	32.91	32.15	1.72	5.34

Table 2.5. qPCR mean Ct values obtained from three DNA extracts in different days used for the determination of repeatability.

Template (<i>H.seropedicae</i> SmR1 DNA)	A			B			C		
	Mean Ct ^a	SD ^r	%RSD _r	Mean Ct ^a	SD ^r	%RSD _r	Mean Ct ^a	SD ^r	%RSD _r
10 ⁶	13.74	0.26	1.91	16.01	0.51	3.17	13.21	0.22	1.67
10 ⁵	16.70	0.94	5.64	19.81	0.24	1.19	16.94	0.53	3.11
10 ⁴	20.26	1.11	5.50	23.01	0.25	1.08	20.24	0.37	1.85
10 ³	23.74	1.16	4.88	26.68	0.21	0.78	23.78	0.44	1.83
10 ²	27.32	1.04	3.80	30.39	0.16	0.54	27.62	0.43	1.57
10 ¹	30.96	1.43	4.63	34.07	0.48	1.40	31.15	0.61	1.97

a Mean Ct (n=9)

Table 2.6. qPCR mean Ct values obtained from three different DNA extracts in three different PCR runs, used for the determination of repeatability.

Template (<i>H.seropedicae</i> SmR1 DNA)	R1			R2			R3		
	Mean Ct ^a	SD ^r	%RSD _r	Mean Ct ^a	SD ^r	%RSD _r	Mean Ct ^a	SD ^r	%RSD _r
10 ⁶	14.60	1.72	11.81	14.21	1.45	10.21	14.15	1.32	9.36
10 ⁵	17.41	2.18	12.54	18.12	1.68	9.28	17.92	1.50	8.35
10 ⁴	20.70	2.23	10.77	21.45	1.40	6.54	21.36	1.27	5.95
10 ³	24.17	2.31	9.57	25.05	1.52	6.06	24.98	1.31	5.23
10 ²	27.90	2.22	7.97	28.75	1.56	5.44	28.68	1.35	4.70
10 ¹	31.27	2.32	7.41	32.34	1.97	6.11	32.58	1.02	3.14

^a Mean Ct (n = 9)

Table 2.7. Parameters of qPCR standard curves for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 quantification using inoculated maize root DNA serial dilution or bacterial DNA serial dilution in the presence of background control maize root DNA.

DNA sample	Efficiency (%)	Slope	R ²
Inoculated maize root DNA			
D	108	-3.14	0.99
E	118	-2.95	0.98
F	113	-3.04	0.99
Bacterial DNA plus control maize root DNA			
A+M	95	-3.44	0.99
B+M	99	-3.34	0.97
C+M	103	-3.24	0.99

D, E and F are inoculated maize DNA extracts

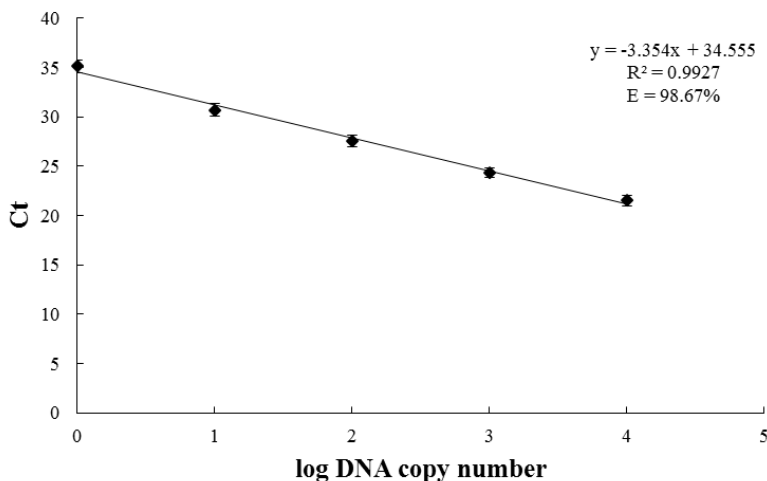
A, B and C are bacterial DNA extracts

M is maize control DNA extract (fixed amount of 6 ng per well)

2.3.3. qPCR reaction parameters for maize quantification

Reaction parameters for maize DNA quantification were determined using primers ZM1 (DINON et al., 2011) and standard curves prepared from 10-fold serial dilutions ranging from 10^4 to 10^0 genome copies. Four DNA samples isolated from control maize root samples were used for construction of the standard curves. The reaction parameters (efficiency, slope and correlation coefficient) were calculated by plotting the Ct values against the \log_{10} DNA copies (Figure 2.2). The obtained standard curve presented an efficiency of 98.67% and a correlation coefficient of 0.99.

Figure 2.2. qPCR standard curve generated using 4 DNA extractions from maize (*Zea mays*) as template DNA and ZM1 (hmg) primers for qPCR quantification of maize DNA. Average Ct \pm SD (n = 10).



2.3.4. Quantification of *H. seropedicae* DNA in maize root samples

Maize germinated seeds were inoculated with *H. seropedicae* (10^5 bacterial cells per seed) and seedlings were harvest 1, 4, 7 and 10 DAI (maize seedlings grown *in vitro*) and 4, 7 and 10 DAI (maize seedlings grown in pots). DNA samples isolated from inoculated and non-inoculated maize roots were used as template in qPCR in order to quantify *H. seropedicae* DNA. The amount of *H. seropedicae* copy number was estimated using the mean standard curve previously calculated (Figure 2.1-A). Regarding DNA samples from inoculated maize roots, PCR was performed in triplicate and Ct values ranged from 25.84 (one DAI) to 13.94 (ten DAI). For the DNA samples isolated from control maize samples, PCR was performed in duplicate and only late Ct values (>35) were observed. These late Cts correspond to unspecific amplification under the established experimental conditions. For the *in vitro* experiment, quantification results showed that bacterial DNA copy number per gram of root fresh weight increased from 5.16×10^7 (one DAI) to 1.42×10^9 (ten DAI) (Figure 2.3). For the plants grown in pots,

bacterial DNA copy number per gram of root fresh weight ranged from 3.25×10^6 (four DAI) to 3.5×10^6 (ten DAI) (Figure 2.4).

Figure 2.3. Bacterial DNA copy number/g of root (fresh weight) of maize seedlings grown *in vitro* after inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 DKB240 variety. Inoculated samples collected 1, 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI). Data are presented as means \pm SD (n=9).

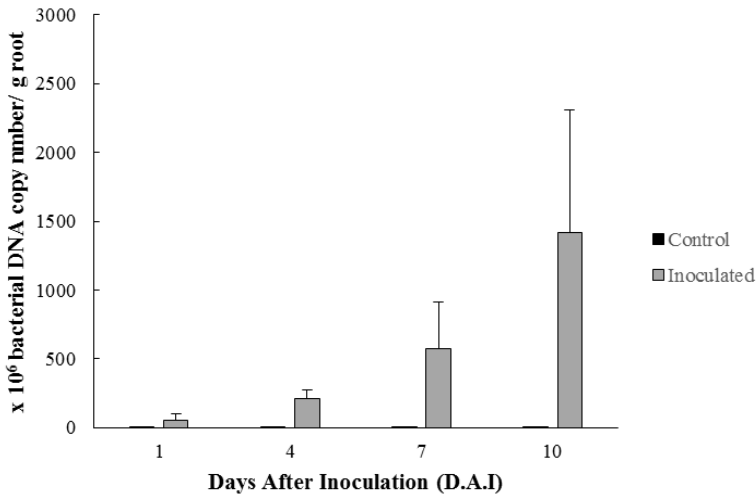
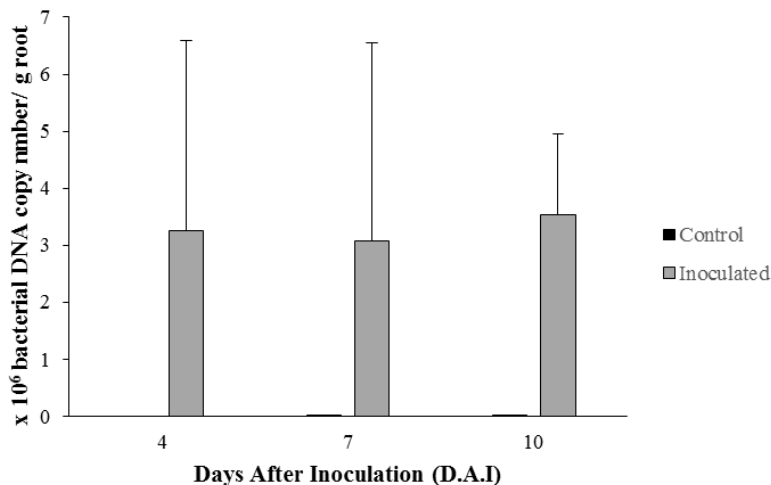


Figure 2.4. Bacterial DNA copy number/g of root (fresh weight) of maize seedlings grown in pots after inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 DKB240 variety. Inoculated samples collected 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI). Data are presented as means \pm SD (n=9).



2.3.5. Quantification of maize DNA in maize root samples

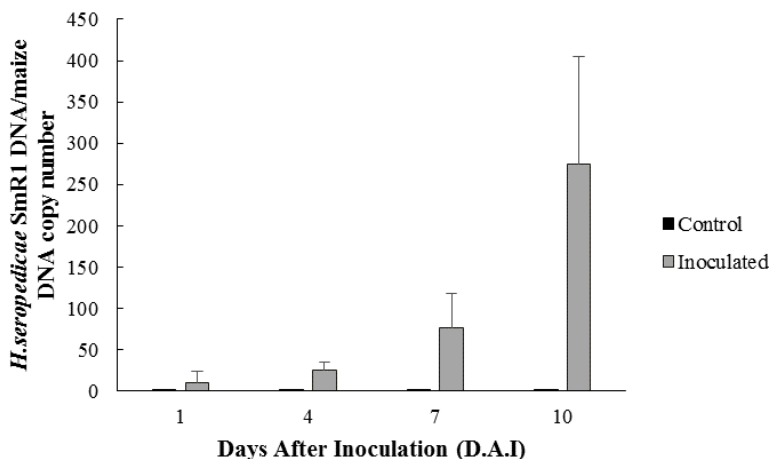
DNA samples isolated from inoculated and non-inoculated maize roots were used as template in qPCR reactions targeting *hmg* gene (primers ZM1) in order to quantify maize DNA. The amount of maize DNA copy number was estimated using the mean standard curve previously calculated (Figure 2.2). Results for all samples showed a mean Ct value of 22.51 ± 0.29 , corresponding to an average value of 4000 diploid maize genome copies per reaction.

2.3.6. Ratio between *H. seropedicae* SmR1 and maize copy numbers

Using the copy numbers obtained by qPCR from bacterial DNA quantification and maize DNA quantification, the number of *H. seropedicae* genome copies in relation to the number of maize DNA copies was determined for plants grown *in vitro*. The results showed an increase in the number of *H. seropedicae* SmR1 DNA copies when

compared to the number of maize DNA copies. Ratios ranged from 10 (one DAI) to 275 (ten DAI), as shown in Figure 2.5.

Figure 2.5. Ratio bacterial DNA copy number per maize DNA copy number of maize seedlings grown in vitro after inoculation with *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 DKB240 variety. Inoculated samples collected 1, 4, 7 and 10 days after inoculation (DAI). Data are presented as means \pm SD (n=9).



2.4. DISCUSSION

It has been shown *Herbaspirillum* spp. are able of entering and rapidly colonizing roots, stems and leaves of host plants, through cortical intercellular infection and invasion of the xylem vessels (CHUBATSU et al., 2012; JAMES, E. K. et al., 1997; MONTEIRO, R. et al., 2012). However, the mechanisms involving such interaction remain unclear and studies attempting to contribute for the understanding of these mechanisms are necessary. Understanding the plant-bacterial associations is important for future biotechnological applications, such as using bacteria species as plant biofertilizers, and could be an important tool to improve crop production, conserve biodiversity and sustain agro-ecosystems (STETS et al., 2013). In order to evaluate the plant-microbe interaction between maize and *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, maize seedlings were inoculated with *H. seropedicae* SmR1 and analyzed 1, 4, 7 and 10 DAI.

Using the *H. seropedicae* strain SmR1 genome recently published (PEDROSA et al., 2011), two primer pairs were designed (Table 2.1) for specific detection and quantification of *H. seropedicae*. In order to verify the specificity of the primers, a qPCR assay was performed using both primer pairs and DNA samples extracted from different bacterial species. Primer HERBAS1 presented amplification (late Ct) for eleven analyzed DNA samples. However, Δ Ct observed between *H. seropedicae* SmR1 (Ct = 13.37) and the other bacteria (Ct > 25.59) is sufficient to propose the use of this primer pair because the majority of these amplifications are non-specific and they are easily distinguishable by their Tm (Table 2.2) and melting curves (Figures S1 and S2). When we compare the Ct values (Table 2.2) for different species of *Herbaspirillum*, Ct observed with 6 ng of *H. rubrisubalbicans* corresponded to Ct observed using 0.006 ng of *H. seropedicae* and Ct observed with 6 ng of *H. huttiense* corresponded to Ct observed using 0.0006 ng of *H. seropedicae*, therefore it is possible to quantify *H. seropedicae* DNA using this assay.

Primer HERBAS2 also presented a high Δ Ct values between *H. seropedicae* SmR1 and other bacteria. However, the amplification reactions using primer HERBAS2 generated amplicons with similar Tm for *Hesbaspirillum* species. Since these amplicons cannot be distinguishable by the Tm analysis (Figures S2 and S3), the primer HERBAS2 was not considered specific enough to be used for the detection and quantification of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. Such approach of analyzing Ct and Tm to detect and distinguish organisms by qPCR was also successfully used for detection of *Ochroconis lascauxensis*, involved in the formation of the black strains in Lascaux cave (MARTIN-SANCHEZ et al., 2013), in the identification of *Listeria* species in contaminated food (JIN et al., 2012) and for the identification of the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (KANG et al., 2012).

In order to test the HERBAS1 primers for quantification of *H. seropedicae* DNA, the reaction parameters were determined and the repeatability of this assay was evaluated using 10-fold serial dilutions of *H. seropedicae* SmR1 DNA. The standard curves presented suitable reaction parameters (Figure 2.1-A). A reliable standard curve should present a R² value higher than 0.95 and a slope between -3.9 and -3.0, corresponding to PCR efficiencies between 80% and 115%, respectively (ZHANG, T.; FANG, 2006). On the other hand, for Genetically Modified Organisms (GMO) analysis, the parameters of the standard

curve should be more restrictive, presenting a R^2 higher than 0.98 and a slope between -3.6 and -3.1, which correspond to PCR efficiencies between 90% and 110% (COSTA et al., 2012). The parameters obtained in the present work ($R^2=0.99$ and $E=91\%$) fit in the restrictive parameters required for the GMO analysis resulting in an accurate and reliable detection and quantification of *H. seropedicae*.

According to the European Union Reference Laboratory (EURL) (<http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>) requirements for GMO quantification by qPCR, the repeatability of qPCR expressed as RSD_r should be less than 25%. The results obtained in the present study show that both PCR run and DNA extraction presented low variation, indicating a suitable degree of accuracy of the assay. Also according to the EURL, the sensitivity of a qPCR quantification method can be determined through the limit of detection (LOD). LOD is the lowest amount of sample that can be reliably detected. The qPCR assay developed in this work ensured the reliable detection of amounts of *H. seropedicae* SmR1 DNA ranging between 10^6 genome copies (6.03 ng) to 10^1 genome copies (60.3 fg), showing the high sensitivity of this method (Table 2.4). Similar results were obtained in previous qPCR studies. A LOD of 1 pg (TIMMUSK et al., 2009) was detected in the quantification of *Paenibacillus polymyxa* in the rizhosphere of wild barley. DNA quantification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* presented a LOD of 50 fg (KANG et al., 2012), which corresponds to approximately 10^1 genome copies, an amount close to the DNA amount detected in the present assay.

PCR amplification of DNA samples extracted from plant tissues or other sources can influence the reliability of the quantification (CANKAR et al., 2006). Furthermore, the presence of large amounts of background DNA could also have some effect on the target DNA amplification (ANDERSEN et al., 2006). The results obtained for the standard curve constructed with mixed DNA showed that maize background DNA did not seem to have a negative effect on bacterial DNA amplification and efficiency, once the amplification mean efficiency was 99% in the presence of maize DNA (Table 2.7). Meanwhile the amplification mean efficiency of the standard curve prepared with DNA isolated from inoculated maize roots was 113% (Table 2.7). Such differences in efficiency values in the presence of background DNA could be due to compound or structural conformation that makes template DNA copies inaccessible for the polymerase enzyme during the first PCR cycles. Gradual changes in these

conformations make template copies more and more accessible in the following cycles (CANKAR et al., 2006).

Plant growth-promoting bacteria (PGPB) are becoming an important tool to support plant nutrition in field conditions. Consequently, there is a need of fast methods to monitor the presence of these bacteria in plant tissues. In order to detect and quantify the presence of *H. seropedicae* SmR1, qPCR experiments were performed using primer pair HERBAS1. The results of the quantification experiments obtained in this study showed an increase in the genome copy numbers of *H. seropedicae* in inoculated maize roots along the period of evaluation (1, 4, 7 and 10 DAI). For seedlings cultivated *in vitro*, it was observed that one DAI the number of *H. seropedicae* SmR1 genome copies in maize root were 5.1×10^7 DNA copy number/g root fresh weight, increasing to 1.4×10^9 DNA copy number/g root fresh weight on ten DAI (Figure 2.3). This increase becomes clearer when the bacterial genome copy numbers is estimated in relation to the maize DNA copy numbers (Figure 2.5). These data corroborate the conclusions obtained by Monteiro et al. (2008), which report that *H. seropedicae* colonization and invasion occurs very quickly. This rapid pattern of *H. seropedicae* colonization was also reported in other studies for different crop cultures such as rice, sugarcane and common bean (JAMES, E. et al., 2002; JAMES, E. K.; OLIVARES, 1998; RONCATO-MACCARI et al., 2003b; SCHMIDT et al., 2011).

The sequence targeted by HERBAS1 primer pair occurs as a single copy in the *H. seropedicae* genome, so we can estimate that each *H. seropedicae* genome copy corresponds to approximately one cell (Figure 2.1-B). In this sense, the estimated bacterial cell number in root samples of plants grown *in vitro* (10^7 - 10^9) and in root samples of plants grown in pots (around 10^6), are in similar amounts presented by other studies reporting DNA quantification of other PGPB species. Quantification of *Enterobacter radicincitans* in *Brassica oleracea* plants were found at about 10^8 bacterial cells g⁻¹ root fresh weight (RUPPEL; RUHLMANN; MERBACH, 2006) and quantification of *Azospirillum lipoferum* CRT1 by qPCR was of 10^4 - 10^6 CFU equivalents per g of maize dry roots (COUILLEROT, OLIVIER et al., 2010).

In conclusion, the present study describe a suitable, reliable and accurate qPCR assay for the detection and quantification of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 in maize inoculated roots, using primers HERBAS1, which demonstrated high specificity to the target. This technique can be very useful for monitoring the colonization of the PGPB *H. seropedicae* SmR1 in plant roots.

Acknowledgments

We would like to express our gratitude to Fábio de Oliveira Pedrosa, Leda Chubatsu and Michelle Tadra-Sfeir, Universidade Federal do Paraná, for providing *A. brasilense* strain FP2, *H. seropedicae* strain SmR1 and other *Herbaspirillum*, to Luciane Passaglia for providing *Rhizobium*, *Microbacterium* and *Pseudomonas*. This work was financially supported by National Institute of Science and Technology - Biological Nitrogen Fixation, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Ministry of Science and Technology, Brazil. TPP and FPA were recipients of Master fellowships from CAPES, Ministry of Education, Brazil. FCAB is recipient of post-doctoral fellowship from CAPES PNPd and ACMA is recipient of research fellowship from CNPq (PQ-2).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O emprego de microrganismos associados a plantas com o objetivo de promover o crescimento vegetal e diminuir a utilização de insumos agrícolas, principalmente de fertilizantes químicos, tem ganhado cada vez mais espaço na agricultura mundial. Neste contexto, as BPCV vêm ganhando destaque, pois apresentam a capacidade de estimular efeitos benéficos na saúde e crescimento das plantas as quais estão associadas. No entanto, estudos visando o desenvolvimento de metodologias capazes de mensurar, rápida e confiavelmente, a presença de BPCV quando em associação com as plantas são necessários.

Levando isso em consideração, a realização deste estudo propôs o desenvolvimento de iniciadores para quantificação através da técnica da PCR em Tempo Real, da BPCV *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1, a qual é um microrganismo endofítico que é encontrado em associação com diversas culturas de importância econômica.

Através deste estudo foi possível realizar a quantificação de DNA genômico da BPCV *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 em amostras de milho inoculadas. Foram desenhados iniciadores específicos para detecção e quantificação da bactéria, e após testes de especificidade, utilizando o corante intercalante SYBR Green, foi determinado que o iniciador HERBAS1 era capaz de quantificar a presença de *H. seropedicae* SmR1. No entanto, é importante ressaltar que pode-se desenvolver sondas intercalantes Taqman, o que aumentaria a especificidade da metodologia, fato que é necessário para os estudos envolvendo plantas inoculadas cultivadas em meio axênico, como por exemplo em plantas cultivadas a campo.

O presente estudo serve como base para realização de trabalhos futuros em outras culturas com as quais *H. seropedicae* faz associação simbiótica, tais como cana de açúcar, sorgo, arroz e trigo. Além disso, trabalhos que envolvam a presença de *H. seropedicae* poderão valer-se da utilização destes iniciadores como um método confiável e de rápida execução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, C. B. et al. Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9658-9663, 2006.

ANTOUN, H. et al. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, v. 204, n. 1, p. 57-67, 1998.

ARKHIPOVA, T. N. et al. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. **Plant and Soil**, v. 292, n. 1-2, p. 305-315, 2007.

ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, 2013.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnol Lett**, v. 32, n. 11, p. 1559-70, 2010.

BABALOLA, O. O. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria do not pose any deleterious effect on cowpea and detectable amounts of ethylene are produced. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 747-752, 2007.

BAKKER, P.; PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology**, v. 97, n. 2, p. 239-243, 2007.

BAL, H. B. et al. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. **Plant and Soil**, v. 366, n. 1-2, p. 93-105, 2013.

BALDANI, J. et al. CHARACTERIZATION OF HERBASPIRILLUM-SEROPEDICAE GEN-NOV, SP-NOV, A ROOT-ASSOCIATED NITROGEN-FIXING BACTERIUM. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An Acad Bras Cienc**, v. 77, n. 3, p. 549-79, 2005.

BALDANI, J. I. et al. A 4TH AZOSPIRILLUM SPECIES FROM CEREAL ROOTS. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 56, n. 3, p. 365-365, 1984.

_____. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb nov; And classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BALDANI, V.; BALDANI, J.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5-6, p. 485-491, 2000.

BALSANELLI, E. et al. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 8, p. 2233-44, 2010.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 10, p. 2397-2406, 1999.

BASTIAN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 1, p. 7-11, 1998.

BAUDOIN, E. et al. Applicability of the 16S-23S rDNA internal spacer for PCR detection of the phytostimulatory PGPR inoculant *Azospirillum lipoferum* CRT1 in field soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 25-38, 2010.

BERGER, B.; BROCK, A. K.; RUPPEL, S. Nitrogen supply influences plant growth and transcriptional responses induced by *Enterobacter*

radicincitans in *Solanum lycopersicum*. **Plant and Soil**, v. 370, n. 1-2, p. 641-652, 2013.

BERTANI, G. STUDIES ON LYSOGENESIS .1. THE MODE OF PHAGE LIBERATION BY LYSOGENIC ESCHERICHIA-COLI. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293-300, 1951.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 199-209, 2008.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BODDEY, R. M. et al. EFFECT OF INOCULATION OF AZOSPIRILLUM SPP ON NITROGEN ACCUMULATION BY FIELD-GROWN WHEAT. **Plant and Soil**, v. 95, n. 1, p. 109-121, 1986.

_____. Use of the (15)N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N(2) fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 889-895, 2001.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C. et al. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 113-125, 2012.

CANKAR, K. et al. Critical points of DNA quantification by real-time PCR--effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BMC Biotechnol**, v. 6, p. 37, 2006.

CARVALHAIS, L. C. et al. Linking Plant Nutritional Status to Plant-Microbe Interactions. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 13, 2013.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A NEW ACID-TOLERANT NITROGEN-FIXING BACTERIUM ASSOCIATED WITH SUGARCANE. **Plant and Soil**, v. 108, n. 1, p. 23-31, 1988.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 783-787, 2000.

CHUBATSU, L. S. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, 2012.

CORDEIRO, F. A. et al. Proteomic Analysis of *Herbaspirillum seropedicae* Cultivated in the Presence of Sugar Cane Extract. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 3, p. 1142-1150, 2013.

COSTA, J. et al. Single-Tube Nested Real-Time PCR as a New Highly Sensitive Approach to Trace Hazelnut. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 33, p. 8103-8110, 2012.

COUILLEROT, O. et al. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298-2305, 2010.

_____. Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 528-538, 2010.

_____. Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* consortia for promotion of maize growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4639-4649, 2013.

CRUZ, L. M. et al. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.

DAY, J. M.; NEVES, M. C. P.; DOBEREINER, J. NITROGENASE ACTIVITY ON ROOTS OF TROPICAL FORAGE GRASSES. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 107-112, 1975.

DE SALAMONE, I. E. G.; HYNES, R. K.; NELSON, L. M. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 404-411, 2001.

DE SOUZA, R. et al. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, v. 366, n. 1-2, p. 585-603, 2013.

DERMASTIA, M. et al. A CELLULAR STUDY OF TEOSINTE ZEA MAYS SUBSP PARVIGLUMIS (POACEAE) CARYOPSIS DEVELOPMENT SHOWING SEVERAL PROCESSES CONSERVED IN MAIZE. **American Journal of Botany**, v. 96, n. 10, p. 1798-1807, 2009.

DESALAMONE, I. E. G. et al. Biological nitrogen fixation in Azospirillum strain-maize genotype associations as evaluated by the N-15 isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, n. 3, p. 249-256, 1996.

DINON, A. et al. Development and validation of real-time PCR screening methods for detection of cry1A.105 and cry2Ab2 genes in genetically modified organisms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 1433-1442, 2011.

DOBEREINER, J.; MALAVOLTA, E. NITROGEN-FIXATION IN GRASSES. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 47, n. 3-4, p. 566-567, 1975.

EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of nif genes of *Azoarcus* sp strain BH72 in rice roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 9, p. 813-819, 1999.

ELBADRY, M. et al. Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 113, n. 6, p. 247-251, 2006.

ELBELTAGY, A. et al. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 11, p. 5285-93, 2001.

ESTRADA, G. et al. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v. 369, n. 1-2, p. 115-129, 2013.

FAN, B. et al. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 4, p. 303-311, 2011.

FANG, R. et al. Promotion of plant growth, biological control and induced systemic resistance in maize by *Pseudomonas aurantiaca* JD37. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1177-1185, 2013.

FAOSTAT. Statistical database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 2012.

FASOLI, E. et al. Searching for allergens in maize kernels via proteomic tools. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 3, p. 501-510, 2009.

GALISA, P. et al. Identification and validation of reference genes to study the gene expression in *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources using RT-qPCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 1, p. 1-7, 2012.

GANG, W.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. INDUCTION OF SYSTEMIC RESISTANCE OF CUCUMBER TO COLLETOTRICHUM-ORBICULARE BY SELECT STRAINS OF PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA. **Phytopathology**, v. 81, n. 12, p. 1508-1512, 1991.

GAUT, B. S. et al. Maize as a model for the evolution of plant nuclear genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 13, p. 7008-7015, 2000.

GRANT, C. A. et al. Crop yield and nitrogen concentration with controlled release urea and split applications of nitrogen as compared to non-coated urea applied at seeding. **Field Crops Research**, v. 127, p. 170-180, 2012.

GUTIERREZ-MANERO, F. J. et al. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v. 111, n. 2, p. 206-211, 2001.

GYANESHWAR, P. et al. Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p. 131-145, 2002.

HAYAT, R. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579-598, 2010.

HEID, C. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

HUREK, T. et al. Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 3, p. 233-242, 2002.

HUSSAIN, A.; HASNAIN, S. Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phyto stimulatory efficiency of rhizobacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2645-2654, 2011.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y. M.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 17, n. 10, p. 1078-1085, 2004.

ISOPI, R. et al. DUAL INOCULATION OF SORGHUM-BICOLOR (L) MOENCH SSP BICOLOR WITH VESICULAR-ARBUSCULAR MYCORRHIZAS AND ACETOBACTER-DIAZOTROPHICUS. **Symbiosis**, v. 18, n. 1, p. 43-55, 1995.

JAMES, E. et al. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 9, p. 894-906, 2002.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, n. 2-3, p. 197-209, 2000.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 77-119, 1998.

JAMES, E. K. et al. Herbaspirillum, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of Sorghum bicolor L Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 308, p. 785-797, 1997.

JIN, D. et al. Rapid molecular identification of Listeria species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis. **Fems Microbiology Letters**, v. 330, n. 1, p. 72-80, 2012.

KANG, M. et al. Quantitative in planta PCR assay for specific detection of Xanthomonas oryzae pv. oryzicola using putative membrane protein based primer set. **Crop Protection**, v. 40, p. 22-27, 2012.

KAUSHIK, R.; SAXENA, A. K.; TILAK, K. Selection of Tn5 :: lacZ mutants isogenic to wild type Azospirillum brasilense strains capable of growing at sub-optimal temperature. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 567-570, 2000.

KLASSEN, G. et al. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in Herbaspirillum seropedicae SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 887-891, 1997.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. PLANT-GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA - EVIDENCE THAT THE MODE OF ACTION INVOLVES ROOT MICROFLORA INTERACTIONS. **Phytopathology**, v. 69, n. 9, p. 1034-1034, 1979.

LADHA, J. K. et al. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: Retrospects and prospects. In: SPARKS, D. L. (Ed.). **Advances in Agronomy**, Vol 87. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, v.87, 2005. p.85-156. (Advances in Agronomy). ISBN 0065-2113 0-12-000785-1.

LI, C. H. et al. Quantitative trait loci mapping for yield components and kernel-related traits in multiple connected RIL populations in maize. **Euphytica**, v. 193, n. 3, p. 303-316, 2013.

LIANG, B. et al. Fate of nitrogen-15 as influenced by soil and nutrient management history in a 19-year wheat-maize experiment. **Field Crops Research**, v. 144, p. 126-134, 2013.

LIPP, M. et al. Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. **Journal of Aoac International**, v. 88, n. 1, p. 136-155, 2005.

LIU, F. C. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4617-4625, 2013.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. INDUCTION OF SYSTEMIC RESISTANCE IN CUCUMBER AGAINST FUSARIUM-WILT BY PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA. **Phytopathology**, v. 85, n. 6, p. 695-698, 1995.

LUO, S. L. et al. Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and its potential for remediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 5, p. 1637-1644, 2011.

MACMILLAN, J. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi, and bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 20, n. 4, p. 387-442, 2001.

MALIK, K. A. et al. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant and Soil**, v. 194, n. 1-2, p. 37-44, 1997.

MARKOULATOS, P. et al. Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. **Food Reviews International**, v. 20, n. 3, p. 275-296, 2004.

MARTIN-SANCHEZ, P. M. et al. Real-time PCR detection of *Ochroconis lascauxensis* involved in the formation of black stains in the Lascaux Cave, France. **Sci Total Environ**, v. 443, p. 478-84, 2013.

MARTINEZTOLEDO, M. V. et al. Production of pantothenic acid and thiamine by *Azotobacter vinelandii* in a chemically defined medium and

a dialysed soil medium. **Biology and Fertility of Soils**, v. 22, n. 1-2, p. 131-135, 1996.

MATSUOKA, Y. et al. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 9, p. 6080-6084, 2002.

MIRANSARI, M. Soil microbes and plant fertilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 875-885, 2011.

MITTER, B. et al. Advances in Elucidating Beneficial Interactions Between Plants, Soil, and Bacteria. In: SPARKS, D. L. (Ed.). **Advances in Agronomy, Vol 121**. San Diego: Elsevier Academic Press Inc, v.121, 2013. p.381-445. (Advances in Agronomy). ISBN 0065-2113 978-0-12-407685-3.

MONTEIRO, R. et al. Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. **Fems Microbiology Ecology**, v. 80, n. 2, p. 441-451, 2012.

_____. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 932-937, 2008.

MONTEIRO, R. A. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.

MONTEMURRO, F. et al. Nitrogen indicators, uptake and utilization efficiency in a maize and barley rotation cropped at different levels and sources of N fertilization. **Field Crops Research**, v. 99, n. 2-3, p. 114-124, 2006.

MRKOVACKI, N.; MILIC, V. Use of *Azotobacter chroococcum* as potentially useful in agricultural application. **Annals of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 145-158, 2001.

MULLIS, K. THE UNUSUAL ORIGIN OF THE POLYMERASE CHAIN-REACTION. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-&, 1990.

MULLIS, K.; FALOONA, F. SPECIFIC SYNTHESIS OF DNA INVITRO VIA A POLYMERASE-CATALYZED CHAIN-REACTION. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

MULVANEY, R. L.; KHAN, S. A.; ELLSWORTH, T. R. Synthetic Nitrogen Fertilizers Deplete Soil Nitrogen: A Global Dilemma for Sustainable Cereal Production. **Journal of Environmental Quality**, v. 38, n. 6, p. 2295-2314, 2009.

NOEL, T. C. et al. Rhizobium leguminosarum as a plant growth-promoting rhizobacterium: Direct growth promotion of canola and lettuce. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 279-283, 1996.

OLIVARES, F. L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs Herbaspirillum spp in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197-200, 1996.

OLIVARES, J.; BEDMAR, E. J.; SANJUAN, J. Biological Nitrogen Fixation in the Context of Global Change. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 5, p. 486-494, 2013.

PANDEY, A.; SHARMA, E.; PALNI, L. M. S. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 379-384, 1998.

PECHANOVA, O. et al. Maize proteomics: An insight into the biology of an important cereal crop. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 637-662, 2013.

PEDROSA, F. et al. Genome of Herbaspirillum seropedicae Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **Plos Genetics**, v. 7, n. 5, 2011.

PIMENTEL, J. P. et al. DINITROGEN FIXATION AND INFECTION OF GRASS LEAVES BY PSEUDOMONAS-RUBRISUBALBICANS AND HERBASPIRILLUM-SEROPEDICAE. **Plant and Soil**, v. 137, n. 1, p. 61-65, 1991.

RAJ, M. et al. Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid, Sensitive Detection, and Identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing Greater Yam Anthracnose. **Molecular Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 277-284, 2012.

RASHID, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 217-224, 2012.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.

REVILLAS, J. J. et al. Production of B-group vitamins by two *Azotobacter* strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 3, p. 486-493, 2000.

ROBERTSON, G.; VITOUSEK, P. Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, p. 97-125, 2009.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. et al. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **Fems Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39-47, 2003a.

_____. Root colonization, systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. **Symbiosis**, v. 35, n. 1-3, p. 261-270, 2003b.

RUPPEL, S.; RUHLMANN, J.; MERBACH, W. Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and online emission fingerprinting. **Plant and Soil**, v. 286, n. 1-2, p. 21-35, 2006.

SALEEM, M. et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 635-648, 2007.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743-767, 2013.

SCHMIDT, M. et al. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 182-185, 2011.

SCHNABLE, P. S. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics (November, pg 1112, 2009). **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1040-1040, 2012.

SEVILLA, M. et al. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and N-15(2) incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif(-) mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 358-366, 2001.

SHAHZAD, S. et al. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 57, p. 27-34, 2013.

SHIME-HATTORI, A. et al. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 915-924, 2011.

SIERRA, S. et al. Production of B-group vitamins by two *Rhizobium* strains in chemically defined media. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 5, p. 851-858, 1999.

SORENSEN, J. et al. Molecular tools in rhizosphere microbiology-from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 483-512, 2009.

SOUZA, E. M. et al. CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE NIFA GENE FROM *HERBASPIRILLUM-SEROPEDICAE* STRAIN Z78. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 425-429, 1991.

_____. SEQUENCE AND STRUCTURAL ORGANIZATION OF A NIFA-LIKE GENE AND PART OF A NIFB-LIKE GENE OF HERBASPIRILLUM-SEROPEDICAE STRAIN Z78. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 1511-1522, 1991.

STETS, M. I. et al. Rapid identification of bacterial isolates from wheat roots by high resolution whole cell MALDI-TOF MS analysis. **Journal of Biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 167-174, 2013.

SU'UDI, M. et al. Quantification of Rice Blast Disease Progressions Through Taqman Real-Time PCR. **Molecular Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 43-48, 2013.

TAULE, C. et al. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 35-49, 2012.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671-677, 2002.

TIMMUSK, S. et al. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 13, p. 1847-1852, 1999.

_____. Detection and quantification of *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wild barley (*Hordeum spontaneum*) with real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 3, p. 736-745, 2009.

VALASEK, M.; REPA, J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151-159, 2005.

VAN LOON, L. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243-254, 2007.

VANPEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPERS, B. INDUCED RESISTANCE AND PHYTOALEXIN ACCUMULATION IN BIOLOGICAL-CONTROL OF FUSARIUM-WILT OF CARNATION BY PSEUDOMONAS SP STRAIN WCS417R. **Phytopathology**, v. 81, n. 7, p. 728-734, 1991.

VARGAS, L. et al. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, 2012.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n. 2-3, p. 127-141, 2001.

VESSEY, J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VIDEIRA, S. S. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 51-66, 2012.

VON FELTEN, A.; DÉFAGO, G.; MAURHOFER, M. Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. **J Microbiol Methods**, v. 81, n. 2, p. 108-115, 2010.

WEI, F. et al. Physical and genetic structure of the maize genome reflects its complex evolutionary history. **Plos Genetics**, v. 3, n. 7, p. 1254-1263, 2007.

WENDE, A. et al. Genetic interrelationships among medium to late maturing tropical maize inbred lines using selected SSR markers. **Euphytica**, v. 191, n. 2, p. 269-277, 2013.

YAN, J.; Warburton, M.; CROUCH, J. Association Mapping for Enhancing Maize (*Zea mays* L.) Genetic Improvement. **Crop Science**, v. 51, n. 2, p. 433-449, 2011.

YONEKURA-SAKAKIBARA, K. et al. Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to cis-zeatin. **Plant Physiology**, v. 134, n. 4, p. 1654-1661, 2004.

ZAMIOUDIS, C. et al. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 304-318, 2013.

ZHANG, G. D. et al. Fine mapping a major QTL for kernel number per row under different phosphorus regimes in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 6, p. 1545-1553, 2013.

ZHANG, T.; FANG, H. H. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 70, n. 3, p. 281-9, 2006.

ZHOU, S. et al. A Single Molecule Scaffold for the Maize Genome. **Plos Genetics**, v. 5, n. 11, 2009.

ZIADI, N. et al. Across a landscape, soil texture controls the optimum rate of N fertilizer for maize production. **Field Crops Research**, v. 148, p. 78-85, 2013.

APÊNDICES

Table S1. Plate counting (aliquot 0.1 mL) of *H. seropedicae* SmR1 culture (OD_{600nm} 0.8) after serial dilution.

Serial dilution	Plate count	CFU/mL
10 ⁻⁴	>500	-
10 ⁻⁵	475	4.75 x 10 ⁸
	503	5.03 x 10 ⁸
10 ⁻⁶	68	6.77 x 10 ⁸
	50	5.03 x 10 ⁸
10 ⁻⁷	6	6.00 x 10 ⁸
	5	5.00 x 10 ⁸

(n = 6)

Table S2. Ct and Tm values generated by qPCR specificity assay with two annealing temperatures (61 or 63°C) using primers HERBAS1 and DNA extracted from *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 or other bacteria as template DNA

Annealing temperature		61 °C			63 °C			
Template DNA ^a	Mean Ct	Tm1	Tm2	Tm3	Mean Ct	Tm1	Tm2	Tm3
<i>H. seropedicae</i> SmR1	13.75	83.46	-	-	13.46	83.56	-	-
<i>H. hiltneri</i>	33.35	68.28	76.69	82.73	32.91	69.02	76.24	85.75
<i>H. huttiense</i>	30.48	78.34	-	-	30.82	78.26	70.94	87.31
<i>H. lusitanum</i>	30.19	74.32	84.19	-	30.73	70.12	84.20	-
<i>H. rubrisubalbicans</i>	24.92	71.21	83.46	88.40	26.52	71.40	83.47	88.31
<i>H. frisingense</i>	30.63	71.12	79.07	86.75	31.57	69.84	79.08	84.84
<i>A. brasiliense</i>	33.21	69.65	77.15	83.64	33.57	69.02	77.16	83.65
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i>	38.37	64.53	77.24	86.48	38.16	62.16	81.36	88.13
<i>Rhizobium</i> sp.	34.65	67.00	77.24	85.20	35.78	66.00	77.89	86.85
<i>Microbacterium</i> sp.	36.33	66.09	77.06	86.39	36.00	65.91	88.13	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	30.67	68.74	86.29	-	31.70	68.38	86.30	-
<i>Burkholderia tropica</i>	32.70	68.65	81.26	-	34.38	67.37	81.18	85.39

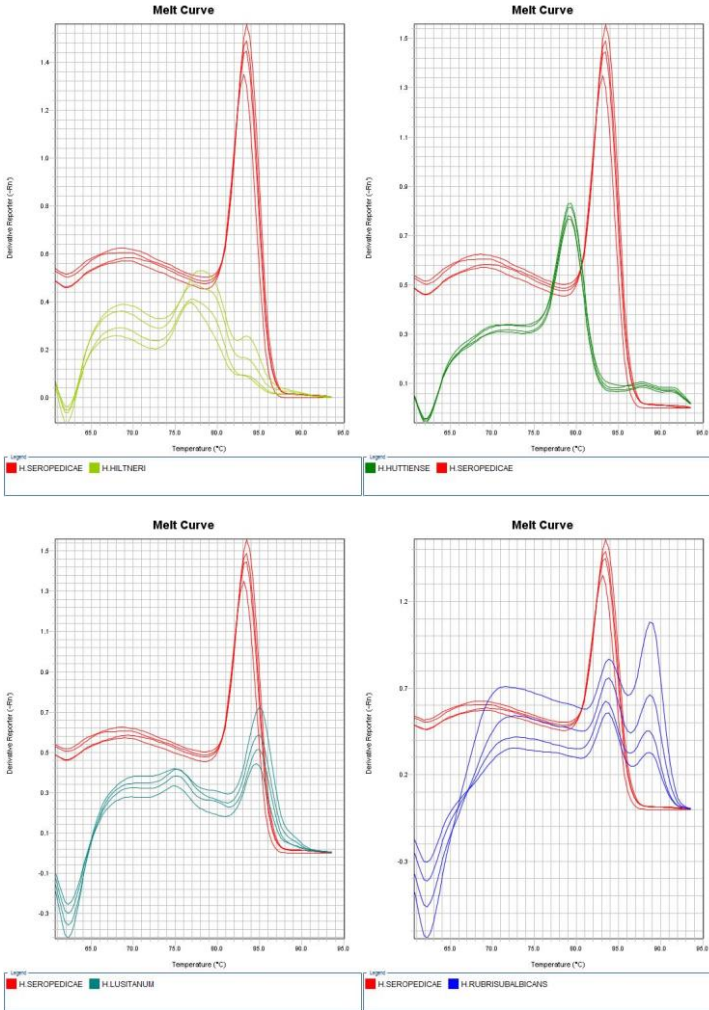
^a Samples were analyzed at a final concentration of 6 ng DNA per reaction for all samples (n=4).

(-) = Ct or Tm not detected

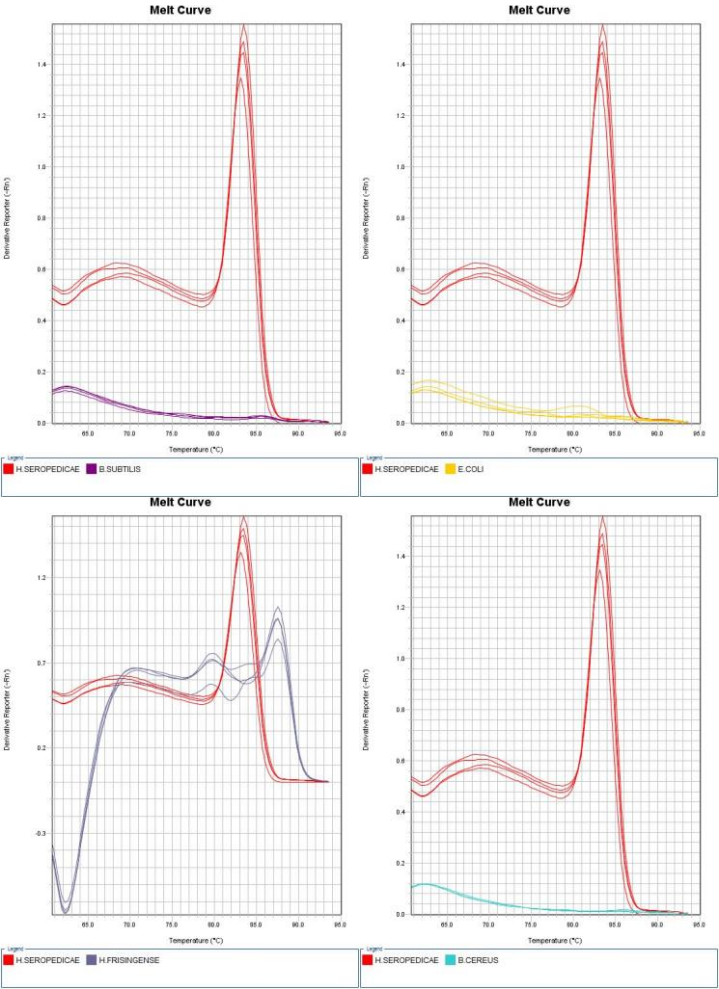
Table S3. Parameters of qPCR standard curves for *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 detection with two annealing temperatures (61 or 63°C) conditions using primers HERBAS1 and bacterial DNA serial dilution.

Annealing temperature 61 °C				63 °C		
DNA Sample	Efficiency (%)	Slope	R ²	Efficiency (%)	Slope	R ²
A	79.52	-3.94	0.998	78.26	-3.98	0.998
B	80.98	-3.88	0.999	82.60	-3.82	0.998
C	81.34	-3.87	0.996	77.34	-4.02	0.999
Mean	80.62	-3.89	0.997	79.40	-3.94	0.998
SD	0.96	0.04	0.001	2.81	0.10	0.001
CV (%)	1.20	0.91	0.10	3.54	2.63	0.10

Figure S1. Melt curve of qPCR using primer pair HERBAS1 of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 (red line) and 12 bacteria: *Herbaspirillum hiltneri*, *Herbaspirillum huttiense*, *Herbaspirillum lusitanum*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum frisingense*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium* sp, *Microbacterium* sp and *Pseudomonas* sp. (Continua)



(Continuação)



(Continuação)

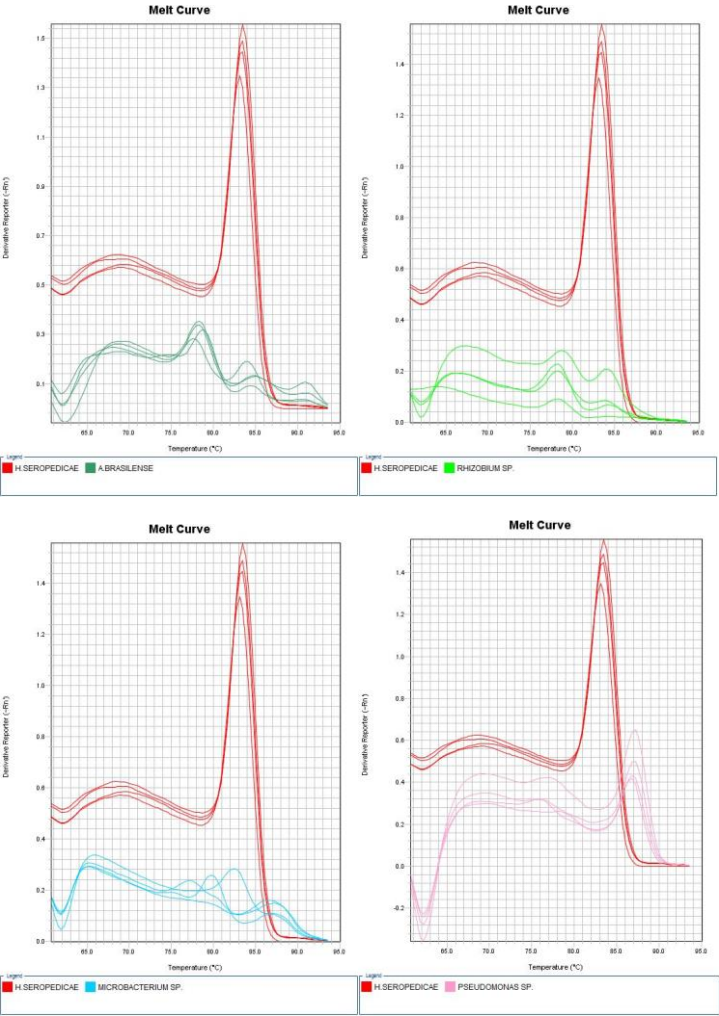
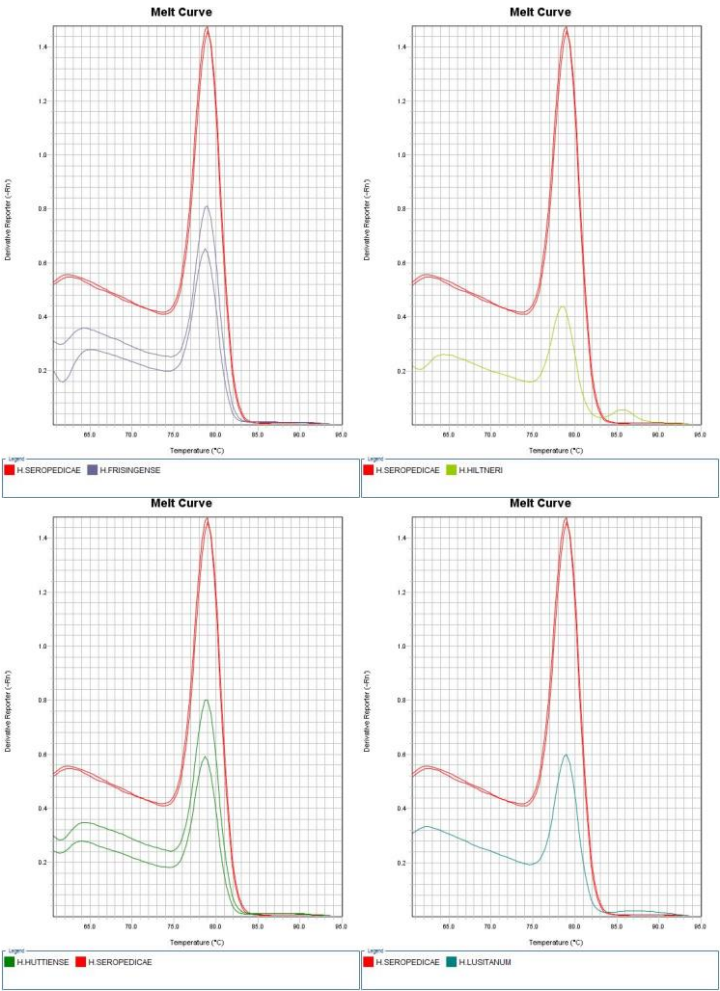


Figure S2. Melt curve of qPCR using primer pair HERBAS2 of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 (red line) and 6 bacteria: *Herbaspirillum frisingense*, *Herbaspirillum hiltneri*, *Herbaspirillum huttiense*, *Herbaspirillum lusitanum*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum brasilense* (Continua)



(Continuação)

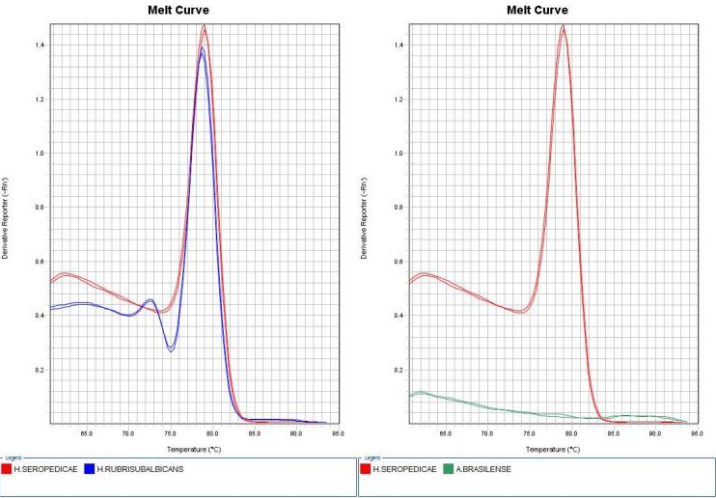


Figure S3. Electrophoresis gel of qPCR amplicon using primers HERBAS1 (76 bp; lanes 2 to 7) and HERBAS2 (63 bp; lanes 8 to 13). Samples: 1 – 50 bp DNA ladder; 2 – *H. hiltneri*, 3 – *H. huttiense*, 4 – *H. lusitanum*, 5 – *H. rubrisubalbicans*, 6 – *H. frisingense*, 7 – *H. seropedicae* SmR1; 8 – *H. hiltneri*, 9 – *H. huttiense*, 10 – *H. lusitanum*, 11 – *H. rubrisubalbicans*, 12 – *H. frisingense*, 13 – *H. seropedicae* SmR1; 14, 15 – Water.

